

Pong, Germaine

1954

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Etude comparée chimique et immunochimique

des polyosides extraits de

S. Typhi, S. paratyphi B et S. Typhi murium

T H E S E

pour l'obtention du diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement

par

Germaine PON

Assistante à l'Institut Pasteur

JURY : (M. FLEURY Président
 (Mlle LAMBIN)
 (M. COURTOIS) Assesseurs

1954



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

Administration :

M. René FABRE, Doyen
M. DELABY, Assesseur,
M. G. CUVIER, Secrétaire général
MM. L. JEANDEL, Secrétaire,
A. QUILLIOT, Rédacteur
M.E. BUVAT, Commis
Mlle M. DENNY, Commis
Mme M.L. ESPINASSE, Rédactrice

PROFESSEURS :

MM. FABRE	Toxicologie.
DELABY	Pharmacie chimique.
PICON	Chimie minérale.
MASCRE	Botanique.
FLEURY	Chimie biologique.
JANOT	Pharmacie galénique.
CHARDONNAT	Chimie organique.
VALETTE	Pharmacodynamie.
BEDEL	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS	Histoire naturelle des Médi- caments simples d'origine végétale.
GUILLOT	Physique.
GAUTIER	Chimie analytique.
LAMBIN (Mlle)	Microbiologie.
N.	Zoologie appliquée.
RAOUL	} Professeurs sans chaire.
DOMANGE	
CRETE	
COURTOIS	

Doyen honoraire : M. RADAIS

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut.
BOUGAULT, HERISSEY, LAUNOY.

MAITRES DE CONFERENCE :

MM. MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
CAVIER	Sciences naturelles.
TRUHAUT	Sciences physiques et chimiques.
MOREAU	Sciences physiques et chimiques.
GUY	Sciences physiques et chimiques.
GERMAN	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM. CORRIEZ	Physique.
HARISPE, travaux pratiques	
première année ..	Chimie générale et
	Pharmaceutique
DEYSSON	Botanique.
GIRARD	Chimie biologique.
MANGEOT	T.P. quatrième année
PIETTE	Biologie animale.
RENAULT	Chimie analytique.
DESVIGNES	Microbiologie.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL	Pharmacotechnie galénique.
QUEVAUVILLER	Pharmacodynamie.
WAROLIN	Pharmacotechnie chimique.

Bibliothécaire en Chef . M. GARNIER

Bibliothécaires (Mlle LAVAUD
(Mme KREHMER

A MES PARENTS

A TOUS LES MIENS

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie

qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de cette
thèse. Qu'il nous permette de le
remercier de ses conseils précieux
et de son accueil toujours bien-
veillant.

A Mademoiselle le Professeur S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie

qui a bien voulu faire partie du
Jury de cette thèse, en témoignage
de notre respectueuse reconnaissan-
ce.

A Monsieur le Professeur J. COURTOIS

avec l'expression de notre vive
gratitude.

A Monsieur le Professeur Jacques TRÉFOUËL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine

qui nous a fait le grand honneur
de nous accepter à l'Institut
Pasteur. Nous le remercions très
respectueusement de tout l'inté-
rêt qu'il nous porte et l'assu-
rons de notre entier dévouement
à notre Maison.

Au Docteur Antoine BONNEFOI

Chef du Service des Vaccins à l'Institut Pasteur

qui nous a accueillie dans son service avec une particulière bienveillance et nous a orientée vers la recherche. Qu'il nous permette de le remercier de ses conseils et de ses encouragements et de l'assurer de notre respectueuse reconnaissance.

A Mademoiselle A.M. STAUB

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

qui a inspiré et dirigé constamment cette thèse. Nous n'oublierons jamais avec quelle patience et quel dévouement, elle nous a appris à travailler et a su nous faire goûter la joie de la recherche. Nous sommes heureuse de lui exprimer ici toute notre reconnaissance et notre affection.

Nous sommes heureuse de remercier tous ceux qui nous ont aidée :

Monsieur Pierre GRABAR, Chef du Service de Chimie Microbienne à l'Institut Pasteur, s'est intéressé à la partie immuno-chimique.

Madame le Docteur J. GRABAR et le Docteur L. LE MINOR, Chefs de Laboratoire, nous ont aidée pour la partie bactériologique.

Le Docteur L. GUIBERT, Chef de Laboratoire nous a prodigué : amicalement critiques et conseils.

Le Docteur J. OUDIN, Chef de Laboratoire, a accepté avec une grande bienveillance d'appliquer à nos polyosides des méthodes de précipitation en milieu gélifié.

Mademoiselle HAMON, Chef de Laboratoire, a bien voulu se charger de l'analyse élémentaire de nos polyosides.

Monsieur DEDONDER, Chargé de Recherches au Centre National de Recherche Scientifique, nous a fait profiter de son expérience dans le domaine de la chromatographie.

Nos remerciements vont enfin à tous les membres du laboratoire qui nous ont apporté leur aide, et tout spécialement à Madame COMBES, dont l'amitié nous est si précieuse.

I N T R O D U C T I O N

HISTORIQUE

L'étude de la constitution antigénique des germes appartenant à la famille des Salmonelles a fait l'objet de multiples travaux.

Dès 1903, SMITH et REAGL (1) avaient signalé l'existence d'antigènes somatiques et flagellaires.

WEIL et FELIX (2) en 1917, au cours de leurs études sur le Proteus, montrèrent la présence dans ces germes de deux types d'antigènes O et H, susceptibles de provoquer leur agglutination en présence de sérums spécifiques. Les antigènes O (Onne Hauch - provenant de cultures "sans nappe") ou antigènes somatiques, portés par les corps microbiens, sont thermostables et responsables d'une agglutination en amas fins, des corps microbiens ; les antigènes H (Hauch - provenant de cultures en "nappes" - l'étalement de la culture étant dû à la mobilité des germes pourvus de flagelles), sont portés par les flagelles, ils sont thermolabiles et provoquent la formation d'amas floconneux, plus volumineux que ceux dus à la présence d'antigènes O, dans lesquels les germes ne s'accolant pas par leurs flagelles.

ARKWRIGHT (3) avait remarqué qu'une même souche peut donner sur gélose des colonies à surface lisse (colonies "smooth") contenant l'antigène O et des colonies à surface rugueuse (colonies "rough") qui sont dépourvues de cet antigène, ces dernières, comme les colonies lisses, pouvant être pourvues de flagelles, donc mobiles, ou immobiles sans flagelles. Les cultures sont d'autant plus brillantes et lisses, et par conséquent, d'autant plus riches en antigène O, qu'elles contiennent moins de germes susceptibles de donner des colonies rugueuses. Par repiquages renouvelés sur gélose on peut passer de la forme "smooth" à la forme "rough", mais non de la forme "rough" à la forme "smooth" (sauf exceptionnellement). Dans le cas d'une culture pauvre en éléments "smooth", on peut éliminer les éléments "rough" par passage sur souris. C'est ce que nous avons été amenée à faire avec la souche de S. para B que nous avons utilisée.

WHITE (4), ensuite, s'attachant à l'étude des Salmonelles différencie plusieurs antigènes des types O et H et entreprend la classification qui, reprise et complétée par KAUFFMANN (5), est résumée dans le tableau aujourd'hui classique de WHITE-KAUFFMANN.

Dans cette classification les différents antigènes somatiques O qui ont pu être différenciés jusqu'à maintenant sont représentés par des chiffres romains, les antigènes H par des

chiffres arabes et des lettres. La présence d'antigènes O communs a permis de classer les très nombreuses espèces identifiées (plus de 200 actuellement) en 9 groupes principaux, dont 4 sont particulièrement importants puisqu'on y trouve les principales Salmonelles pathogènes pour l'homme.

Nous donnons dans le tableau I la formule antigénique de quelques Salmonelles appartenant à ces 4 groupes.

Si on injecte à un lapin, à des intervalles de temps convenables, des quantités croissantes de corps microbiens, de l'espèce *S. Typhi murium* par exemple dont la formule antigénique est I IV V XII, 1,1 et 2, le sérum des lapins se chargera d'anticorps correspondant à chacun des antigènes. Si l'on prélève le sérum du lapin et si l'on met en présence de ce sérum des quantités suffisantes de corps microbiens de plusieurs espèces autres que *S. Typhi murium*, contenant ensemble tous les antigènes de *S. Typhi murium* sauf l'un d'eux IV par exemple, on conçoit que, les antigènes fixant les anticorps correspondants du sérum, il ne restera plus dans celui-ci que les anticorps susceptibles de fixer l'antigène IV. Un tel sérum ne provoquera l'agglutination que des germes contenant l'antigène IV. La méthode de CASTELLANI (6) permet ainsi de préparer, par saturation, des sérums spécifiques ne contenant que les anticorps correspondant à un seul antigène.

Avec un jeu complet de sérums spécifiques, il sera aisé de déterminer la formule antigénique exacte d'un germe appartenant à la famille des Salmonelles et il suffira de se reporter au tableau de WHITE-KAUFFMANN (5) pour l'identifier. Cette classification ne cesse de rendre les plus grands services dans le domaine médical par les possibilités d'identification précise et rapide qu'elle a apportées.

Il était du plus haut intérêt pour les immunochimistes d'identifier chimiquement ces antigènes et très vite des recherches ont été entreprises dans ce but. Laissant de côté l'étude des antigènes H dont on sait seulement qu'ils sont de nature protéique, nous ferons un exposé des travaux consacrés à l'étude des antigènes O et nous présenterons notre contribution à cette étude.

Les premières recherches ont eu pour but d'obtenir à partir des germes, des fractions ayant les mêmes propriétés sérologiques que les germes eux-mêmes. KRUMWIEDE et COOPER (7) ont extrait des germes, par l'hypochlorite alcalin, une substance capable de précipiter les immunosérums obtenus en injectant à des lapins des corps microbiens de la même souche que ceux ayant servi à préparer l'extrait, ou d'une souche de constitution voisine. C'est ainsi qu'un sérum anti-O de *S. Typhi* était précipité également bien par les extraits de *S. Typhi* (I IX XII) et *S. enteritidis* (I IX XII), moins bien par les extraits de *S. para B* (I IV V XII) et *S. Derby* (I IV V XII) et pas du tout par les extraits de *S. Newport* (VI VIII) et *S. Cholerae suis* (VI VII) qui n'ont aucun antigène O commun. Dans un sérum anti-*S. Typhi* ne précipitait plus les extraits

TABLEAU I

Formule antigénique de quelques Salmonelles d'après

WHITE-KAUFFMANN

Groupe A	S. paratyphi A	I II XII	a	
	S. para B	I IV V XII	b	1,2
	S. Typhi murium	I IV V XII	i	1,2
B	S. Reading	IV XII	e h	1,5
	S. abortus equi	IV XII		
	S. Derby	(I) IV V XII		
	S. para C	VI XII VI	c	1,5
C	S. Cholerae suis	VI VII	c	1,5
	S. Newport	VI VIII	e h	1,2
	S. Typhi	(I) IX XII VI	d	1,2
	S. enteritidis	I IX XII	g m	
D	S. Gallinarum	I IX XII		
	S. Pullorum	(I) IX XII		

Les chiffres romains représentent les antigènes O

Les chiffres arabes et les lettres, les antigènes H.

de *S. Gallinarum* (I IX XII) après saturation par l'extrait de *S. Typhi* (I IX XII) alors que la saturation par l'extrait provenant de *S. para A* (I II XII) laissait encore des anticorps capables de précipiter l'extrait de *S. Gallinarum* ou de *S. Typhi*, ce qui s'explique par l'absence dans *S. Para A* de l'antigène IX présent dans les deux autres germes.

L'hydrolyse alcaline fournissait donc une substance qui, d'après ces premiers auteurs, conservait la spécificité des germes.

FURTH et LANDSTEINER (8) entreprirent l'étude chimique des préparations extraites par la soude et purifiées par plusieurs précipitations alcooliques. Les produits obtenus réagissaient avec les sérums de façon très proche de celle des germes eux-mêmes, comme les préparations de KRUMWIEDE et COOPER (7), et supprimaient presque totalement les agglutinines des immunsérums comme le montra WHITE (10). Ces extraits ne contenaient que très peu d'azote (0,5 à 1,4 %) et donnaient, après hydrolyse, 70 % de sucres réducteurs : il s'agissait de polyosides. La spécificité semblait donc être liée à cette fraction polyosidique.

Des techniques d'extraction moins brutales permirent à RAISTRICK (11) (digestion trypsique), BOIVIN (12) (défécation trichloracétique) et MORGAN (13) (dissolution dans l'éthylèneglycol) d'obtenir des antigènes complets susceptibles de susciter la formation d'agglutinines lorsqu'on les injectait aux animaux, contrairement aux polyosides des premiers auteurs. Or, dans ces préparations complexes (glucido-lipido-protéidiques) tous les auteurs furent d'accord pour rattacher la spécificité à la fraction polyosidique. MORGAN (14) prépara même des agglutinines antityphiques en injectant aux animaux le polyoside couplé à une protéine étrangère.

L'étude chimique des polyosides extraits des diverses Salmonelles s'imposait donc aux immunochimistes qui s'intéressaient aux bases chimiques de la classification de WHITE-KAUFFMANN.

Plusieurs auteurs ont déjà entrepris cette étude : FREEMAN (15-16), en Angleterre, isola par hydrolyse acétique purifia et analyse les polyosides du bacille typhique (I IX XII) et de *S. Typhi murium* (I IV V XII). ELKIN (17) en Russie isola, par la même hydrolyse acétique, les polyosides des antigènes somatiques extraits par l'acide trichloracétique (méthode de BOIVIN) (12) de trois espèces : *S. Typhi* (I IX XII), *S. Gallinarum* (I IX XII) et *S. Enteritidis* (I IX XII). Enfin YOKOYAMA (18) au Japon, put extraire le polyoside de *S. TYPHI* au moyen de plusieurs hydrolyses acides et alcalines. Nous ne nous étendrons pas ici sur les résultats

qu'ils ont obtenus. Ils seront comparés aux nôtres au cours de la discussion qui suivra l'exposé de nos résultats expérimentaux.

Les études de tous ces auteurs étaient antérieures à la méthode de la chromatographie sur papier : aucun d'eux ne l'utilisa. Ils n'employèrent pas non plus l'analyse immunochimique. Il nous a semblé intéressant de reprendre l'étude des polyosides spécifiques des Salmonelles en utilisant ces deux méthodes.

TRAVAIL PERSONNEL

Nous avons utilisé comme matériel d'étude les germes appartenant à trois espèces de la famille des Salmonelles : S. Typhi, S. para B et S. Typhi murium. S. para B et S. Typhi murium ont une structure antigénique O identique (I IV V XII) et S. Typhi une structure nettement différente (I IX XII).

Deux souches de S. Typhi ont été utilisées :

- a) La souche type O 90I provenant du Centre des Salmonelles de l'Institut Pasteur. Elle est conservée sur milieu à l'oeuf à + 4° et repiquée tous les ans. Elle ne contient ni antigène VI, ni antigène H, mais seulement l'antigène O.
- b) La souche S. Typhi T 50-5 isolée d'un malade en Janvier 1950 et entretenue depuis au Centre des Salmonelles dans les mêmes conditions que la souche S. Typhi O 90I. Elle contient les antigènes O et H mais pas l'antigène VI.

La souche S. paratyphi B 50-19 a été isolée d'un malade en Juin 1950. Elle contient les antigènes O et H.

La souche S. Typhi murium T M 26-52, isolée d'un malade en Juillet 1952, contient les antigènes O et H.

Les polyosides ont été extraits par l'hydrolyse avec une solution N/10 d'acide acétique qui avait permis à FREEMAN (15) d'obtenir des préparations pures de polyosides, précisément à partir des deux espèces que nous avons choisies : S. Typhi et S. Typhi murium. Il nous a semblé intéressant, en effet, de pouvoir comparer les résultats acquis avec la chromatographie sur papier, à ceux obtenus par cet auteur avec d'autres techniques.

PLAN DU TRAVAIL

Nous avons divisé cet exposé en deux parties :

L'une, de beaucoup la plus importante, traitera de toute l'étude proprement chimique des polyosides.

Elle sera divisée en 4 chapitres :

- Préparation des polyosides
- Choix et mise au point des techniques utilisées pour l'étude chimique des polyosides.
- Résultats obtenus
- Discussion des résultats : comparaison de ces résultats avec ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs et étude de leurs rapports avec les caractères immunologiques des germes d'où ont été extraits les polyosides.

Dans la deuxième partie, beaucoup plus courte, nous procéderons à l'étude immunochimique des polyosides et nous en confronterons les résultats avec ceux fournis par l'étude chimique précédente.

ETUDE CHIMIQUE

CHAPITRE I

PREPARATION DES POLYOSIDES

Les divers auteurs (WHITE (19), BOIVIN (12), MORGAN (20), FREEMAN (15), ELKIN (17) HORNUS et GRABAR (21) qui ont préparé le polyoside O typhique par hydrolyse acétique, l'ont extrait soit des microbes eux-mêmes, soit de l'antigène somatique, préalablement extrait des corps microbiens par l'acide trichloracétique ou le di-éthylène glycol. FREEMAN utilisa les deux procédés et aboutit au même polyoside. Une étude comparée des courbes de précipitation d'un immunosérum antityphique par les polyosides montra de même à A.M. STAUB et R. COMBES (22) l'identité immunologique de deux polyosides extraits soit des germes, soit de l'antigène obtenu par l'acide trichloracétique.

Cette identité nous a conduite à employer pour notre étude la méthode d'extraction directe à partir des germes, qui présente l'avantage de supprimer la préparation préalable de l'antigène somatique, et nous avons employé la technique décrite par FREEMAN pour la purification du polyoside extrait du bacille typhique.

Les temps de cette technique sont les suivants :

3 extractions des germes par une solution décinormale d'acide acétique, concentration des hydrolysats sous vide, précipitations fractionnées alcooliques entre 50 et 86 % d'alcool, 3 précipitations par l'acide acétique glacial à 94 %, enfin 3 précipitations fractionnées par l'alcool, pour éliminer l'acide acétique, et dessiccation sur P₂O₅ et sous vide du précipité lavé par l'alcool et l'éther anhydre.

L'alcool, que nous avons utilisé, a toujours été distillé deux fois, la première sur acide phosphorique et la deuxième sur potasse, afin d'éliminer les impuretés qui pourraient précipiter avec le polyoside. Nous avons remarqué en particulier la nocivité des corps gras qui, lors d'une préparation de polyoside avec un lot d'alcool non redistillé, avaient rendu insoluble une grande partie de notre préparation.

Voici à titre d'exemple, tous les détails de la préparation d'un de nos lots de polyoside typhique.

PREPARATION DU LOT I DE POLYOSIDE TYPHIQUE T 50-5.

1) Préparation des germes secs

On contrôle les caractères antigéniques et l'aspect parfaitement "smooth" de la souche utilisée pour obtenir la culture d'où sera extrait le polyoside. après un passage sur bouillon et deux

passages sur gélose nutritive (bouillon de viande peptoné à 10 p. 1.000 d'agar-agar) pour effectuer ce contrôle, on ensemence sur gélose nutritive. La culture de 24 heures est récoltée dans la solution physiologique (environ 10 cm³ par boîte de Roux). On la lave deux fois par un même volume de solution physiologique, puis trois fois par un même volume d'acétone en centrifugeant et en remettant le culot en suspension. Après évaporation de l'acétone, on obtient une poudre fine que l'on doit passer à travers une gaze pour en éliminer les déchets de gélose. La culture sur 200 boîtes de Roux permet d'obtenir environ 50 grammes de germes secs, aussi bien d'ailleurs pour les autres souches que nous avons utilisées que pour la souche T 50-5.

2) Hydrolyse

Il est pratique de traiter successivement 3 lots de 50 g. de germes secs que l'on réunit ensuite pour la purification (schéma II).

50 g. de germes secs sont mis en suspension dans 900 cm³ d'eau distillée et la suspension est chauffée à 90°. Après addition de 100 cm³ d'une solution normale chaude d'acide acétique, on maintient 1 h. 1/2 dans un bain-marie bouillant sous un réfrigérant ascendant ; après refroidissement du ballon sous l'eau courante, on centrifuge. Le surnageant est soigneusement recueilli et le culot est repris dans 720 cm³ d'eau à une température de 90° auxquels on ajoute 80 cm³ d'une solution normale d'acide acétique. On porte à nouveau au bain-marie 1 h. 1/2 et on procède de même une troisième fois pour achever l'extraction. Les trois surnageants recueillis au cours de ces opérations, sont séparément évaporés à sec sous vide à une température voisine de 55° ; les résidus sont repris dans 150 ou 100 cm³ d'eau suivant qu'il s'agit du premier hydrolysate ou des suivants et on élimine l'insoluble par centrifugation.

3) Purification du polyoside

Les trois hydrolysats obtenus, provenant d'un même lot de 50 g. de germes secs, sont conservés à une température de + 4°, après quoi ils sont réunis et précipités par un égal volume d'alcool à 90° qui précipite les impuretés ; après 18 heures à + 4° on centrifuge, on élimine le précipité, on ajoute au surnageant 5 volumes d'alcool, ce qui porte la concentration en alcool à 86% et provoque la précipitation du polyoside. On laisse une nuit à la température du laboratoire et on centrifuge. Le précipité est repris par 100 cm³ d'eau distillée, centrifugé pour éliminer l'insoluble, ensuite gardé à une température de + 4° (les restes d'alcool présents dans le précipité aident à la conservation). Trois lots de 50 g. de germes sont hydrolysés de la même manière, les extraits sont mélangés et traités par 5 nouvelles précipitations fractionnées alcooliques. Les dernières précipitations du polyoside sont facilitées par l'addition de très petites quantités

TABLEAU II

Schéma de la préparation du polyoside par hydrolyse des germes au moyen d'une solution décinormale d'acide acétique (AH N/10)

50 g. germes secs

Hydrolyse AH N/10 1000 cm³ 1h.30

Germes
+ 800 cm³ AH N/10 1h.30

Hydrolysats
concentré à sec
+ 150 cm³ H₂O

germes
+ 800 cm³ AH N/10 1 h.30

Hydrolysats
concentré à sec
+ 100 cm³ H₂O

germes
éliminés

Hydrolysats
concentré à sec
+ 100 cm³ H₂O

+ 350 cm³ alcool (1 volume)

Surnageant
+ 1750 cm³ alcool (5 volumes)

précipité
éliminé

précipité
+ 100 cm³ H₂O

surnageant
éliminé

3 lots de 50 g. de germes secs sont traités de la même façon et réunis pour subir :

5 précipitations fractionnées alcooliques (1 vol. puis 5 Vol)

3 précipitations par 94% d'acide acétique

3 précipitations fractionnées alcooliques (1 vol. puis 5 v.)

3 lavages à l'alcool

2 lavages à l'éther anhydre

séchage sur P₂O₅

Polyoside de 2 g.

d'acétate de sodium. Après la 6ème précipitation alcoolique on reprend le précipité dans 25 cm³ d'eau et on ajoute 395 cm³ d'acide acétique glacial, ce qui porte la concentration à 94%. On fait trois précipitations acétiques, puis encore trois précipitations fractionnées alcooliques. Le polyoside est ensuite lavé deux fois à l'alcool absolu et deux fois à l'éther sulfurique distillé et anhydre, puis desséché sous vide en présence d'anhydride phosphorique.

4) Rendement brut de l'extraction

Nous avons obtenu ainsi à partir de 150 g. de germes secs 2 g. d'une poudre blanche, parfaitement soluble dans l'eau, ce qui donne un rendement brut de 1,3%. FREEMAN (15) n'obtient qu'un rendement de 0,7 %, mais il opère sur des quantités de germes secs beaucoup plus petites que les nôtres. Ceci peut expliquer la différence entre ses résultats et les nôtres, les pertes étant toujours proportionnellement beaucoup plus grandes lorsqu'on travaille sur de petites quantités.

PREPARATION DES POLYOSIDES D'AUTRES SOUCHES

Nous avons suivi exactement la même méthode pour l'extraction des polyosides para B et typhi murium, et leur purification par précipitations alcooliques. Par contre, nous avons dû modifier légèrement les précipitations acétiques : alors que le polyoside typhique précipitait facilement en présence de 94% d'acide acétique, le polyoside para B n'était précipité que par 96% d'acide acétique. La première précipitation du polyoside typhi murium a été obtenue avec 94% d'acide acétique, mais nous avons dû ajouter 96% d'acide pour la deuxième précipitation. Après centrifugation le surnageant était encore opalescent ; une nouvelle portion de polyoside a été précipitée en ajoutant 1 % d'acide, soit 97% en tout. En outre, nous avons remarqué que l'aspect des polyosides para B et typhi murium était différent de celui du polyoside typhique au cours des précipitations acétiques : tandis que les précipités de polyoside typhique sont blancs et opaques, les précipités des autres polyosides sont translucides et deviennent gélatineux dès qu'ils sont à l'air.

Le poids de polyoside obtenu à partir de 150 g. de germes secs para B est d'environ 2 g. comme pour le polyoside typhique. Par contre la souche de typhi murium nous a fourni seulement 1,4 g. de polyoside pour la même quantité de germes secs, ce qui abaisse le rendement brut au dessous de 1%.

CHAPITRE II

CHOIX ET MISE AU POINT DES TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDECHIMIQUE DES POLYOSIDES.

Ayant obtenu les polyosides en utilisant la technique que nous avons décrite dans le chapitre I, nous nous sommes attachée à vérifier leur degré de pureté en dosant l'azote qu'ils pouvaient encore contenir, par la technique du microdosage de KJELDAHL. Notre catalyseur est une solution saturée de sulfate de potassium additionnée de 0,5 % de sulfate de cuivre : le dosage est effectué au moyen d'une solution N/70 de HCl sur le distillat recueilli dans l'acide borique à 2%. La teneur en azote de nos polyosides est toujours très faible mais non négligeable; nous avons donc été amenée à rechercher si on ne pouvait attribuer cet azote à la présence de glucosamine que nous avons dosée par la méthode classique d'ELSON et MORGAN (23). Plusieurs auteurs ont étudié et modifié les détails de cette méthode dont le principe est le suivant : la glucosamine, transformée en acétyl-glucosamine par chauffage en présence d'acétyl-acétone en milieu alcalin, se colore en rouge avec le réactif d'EHRLICH. Nous avons retenu les détails indiqués par RIMINGTON (24) exposés dans "les techniques de laboratoires" de LOISELEUR (25).

Avant d'aborder l'étude des sucres constitutifs des polyosides, nous avons dosé les groupements acétylés par la méthode mise au point par J. TABONE (26) que nous exposons ci-dessous, et dont le principe est le suivant :

L'acide acétique est libéré par hydrolyse, puis entraîné par la vapeur d'eau et dosé dans le distillat par la soude. L'agent d'hydrolyse est l'acide para-toluène-sulfonique.

J. TABONE a étudié les différents agents d'hydrolyse employés habituellement pour le dosage des radicaux acétylés des polyosides. L'hydrolyse alcaline libère des acides volatils qui souillent le distillat, les acides chlorhydrique et sulfurique décomposent les hexoses en un mélange d'acide lévulique et d'acide formique. Par contre les acides volatils autres que l'acide acétique libérés par l'acide para-toluène-sulfonique sont en quantité minime et peuvent être détruits par l'action de l'oxyde rouge de mercure, en présence d'acide sulfurique et de sulfate de magnésium; ce traitement détruit les acides lactique, formique et pyruvique qui souillent souvent les distillats d'acides volatils provenant de produits microbiens.

Nous avons suivi exactement la technique indiquée par J. TABONE pour la purification des réactifs pour le dosage :

Dosage des groupements acétylés

On ajoute à un volume de la solution à doser le même volume d'acide para-toluène-sulfonique à 50 % et on hydrolyse à 100° à reflux. Ensuite l'hydrolysats est distillé sous vide et le résidu est soumis à l'entraînement par la vapeur d'eau. Il est bon de faire 10 entraînements, chacun par 10 cm³ d'eau. Le distillat est porté à l'ébullition à reflux pendant quinze minutes en présence de 0,5 g. d'oxyde rouge de mercure, 20 g. de sulfate de magnésium et 2 cm³ d'acide sulfurique à 50 p. 100. Après une nouvelle distillation et 5 entraînements à la vapeur d'eau, on titre l'acide acétique du distillat par une solution N/20 de soude en présence de phénol-phtaléine.

Les résultats fournis par ces quelques dosages préliminaires, joints à ceux fournis par l'analyse élémentaire nous ont permis de faire le bilan des éléments autres que les sucres contenus dans nos préparations ; il nous fallait ensuite déterminer ces sucres et si possible leurs proportions. Ceci nous a amenée à choisir et adapter des méthodes appropriées :

A) au dosage des sucres réducteurs, pour pouvoir établir les courbes d'hydrolyse de nos polyosides,

B) à l'identification des sucres ainsi libérés par l'hydrolyse,

C) au dosage des différents sucres coexistants dans nos hydrolysats.

A) Dosage des sucres réducteurs

Parmi les nombreuses méthodes proposées pour le dosage des sucres réducteurs, nous avons choisi celle de SOMOGYI-NELSON (27-28). Cette méthode, sensible, fidèle et simple, permettant le dosage précis de 40 microgrammes de sucre, était celle qui nous convenait le mieux. Toutefois, nos résultats différant notablement de ceux trouvés par FREEMAN (15-16) avec des polyosides, obtenus par la même méthode de préparation, nous avons également utilisé la méthode de HAGEDORN-JENSEN (29) employée par FREEMAN.

I. Méthode de SOMOGYI-NELSON

La méthode de SOMOGYI (27) est basée sur la réduction du sulfate de cuivre par le sucre à doser. L'oxyde cuivreux formé est ensuite dosé par iodométrie. NELSON (28) a modifié cette méthode en remplaçant le dosage iodométrique par un dosage colorimétrique qui est plus sensible : l'oxyde cuivreux

forme un complexe coloré avec le réactif arséno-molybdique qu'indique l'auteur.

a) Réactifs

Réactif de Somogyi :

phosphate disodique anhydre	28 g.
sel de Seignette	40 g.
eau bidistillée	environ 350 g.
après dissolution ajouter tout en agitant :	
NaOH N	100 cm ³
solution de SO ₄ Cu à 10%	80 cm ³
SO ₄ Na ₂	180 g.
eau bidistillée	Q.S.P. 1.000 cm ³
laisser le réactif 48 heures à l'étuve à 37° et filtrer.	

Réactif arséno-molybdique de NELSON :

Molybdate d'ammonium	25 g.
dissous dans 450 cm ³ d'eau bidistillée	
SO ₄ H ₂ concentré	21 cm ³
AsO ₄ Na ₂ H ₇ , 7 H ₂ O	3 g.
dissous dans 25 cm ³ d'eau bidistillée.	
Laisser 48 heures à l'étuve à 37°.	
Le réactif obtenu doit être jaune clair et non vert.	
Cela nécessite l'emploi d'un arséniate pur qui doit donner dans l'eau une solution complètement incolore.	
-Le réactif de SOMOGYI et celui de NELSON se conservent bien pendant quelques mois, si on les garde en flacon émeri à l'abri de la lumière.	

b) Dosage

Dans une série de tubes jaugés de 20 cm³, on met 2 cm³ de diverses concentrations de la solution sucrée, puis 2 cm³ du réactif de SOMOGYI dilué au 1/2; on mélange et on bouche au coton cardé. On porte 20 minutes au bain-marie bouillant, on refroidit rapidement et on ajoute 1 cm³ du réactif de NELSON. On agite et on complète à 20 cm³ avec de l'eau bidistillée. Après 15 minutes on lit au photomètre. Nous employons le photomètre à réseau de Bonet-Maury en utilisant la longueur d'onde de 550 millimicrons (filtre vert). La coloration est stable pendant au moins une heure.

Pour les faibles concentrations en sucres, nous employons des tubes jaugés de 10 cm³ seulement, les différents temps du dosage étant les mêmes, seul le volume final est différent.

Les résultats obtenus avec cette technique sont constants. Néanmoins, à chaque série, pour nous assurer de la bonne marche du dosage, nous refaisons trois points de la courbe de glucose et nous rapportons nos résultats à cette droite témoin. On obtient ainsi d'excellents résultats à condition toutefois :

- d'utiliser une vaisselle rigoureusement propre (vaisselle lavée au mélange sulfo-chromique)

- d'être très attentif à la limpidité des réactifs, que l'on doit filtrer avant chaque dosage, en prenant soin d'utiliser des papiers filtres ne contenant pas de substances réductrices. Le papier Whatman n° 1 nous a donné entière satisfaction.

- de respecter les conditions suivantes concernant le chauffage : le bain-marie ne doit pas cesser de bouillir au moment où l'on introduit les tubes. Ceux-ci doivent être assez écartés pour que la température de 100° soit atteinte dans le minimum de temps. La durée du chauffage est chronométrée à la seconde près et, aussitôt qu'elle est terminée, les tubes sont plongés dans l'eau froide, afin que la réaction cesse immédiatement.

- de maintenir la constance absolue du pH ; ceci oblige à neutraliser les hydrolysats acides après dilution (environ 1/10) dans un tampon phosphate M/15, pH 7,5 (PO_4HNa_2 M/15 84,1 cm³, PO_4KH_2 M/15 15,9 cm³) qui ne gêne pas la réaction et favorise la neutralisation exacte de l'acide utilisé pour l'hydrolyse.

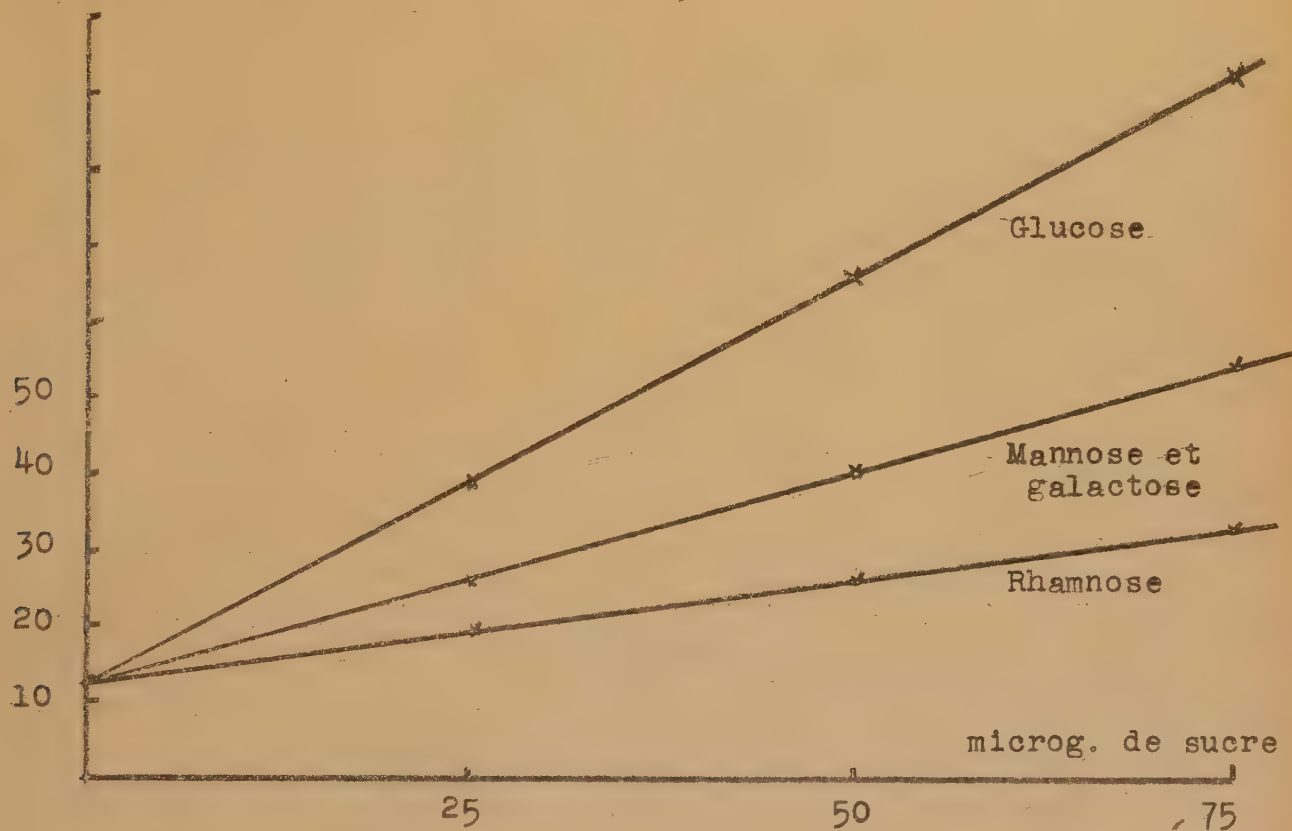
- que les solutions sucrées soient conservées à la glacière et utilisées le plus vite possible après leur préparation afin d'éviter les contaminations ; nous avons dû renoncer à l'emploi du merthiolate qui perturbe le dosage.

Avec cette méthode, comme avec toutes celles utilisées pour le dosage des sucres réducteurs, la pente de la courbe étalon varie avec chaque sucre (figure 1). Au cours des courbes d'hydrolyse, nous avons rapporté tous nos résultats à la droite donnée par le glucose. Il est bien entendu que les chiffres obtenus n'ont dans ces conditions qu'une valeur relative, la véritable teneur en sucres réducteurs des polysides ne pouvant être établie que lorsqu'on connaît les sucres constitutifs et leur proportion.

Figure IDosage des sucres réducteurs par la méthode de SOMOGYI-NELSON

Variation de la densité optique en fonction de la concentration pour les sucres présents dans le polyoside typhique.

Divisions du photomètre



II. Méthode de HAGEDORN-JENSEN (28)

Elle est basée sur le principe suivant : en milieu alcalin les glucides réduisent le ferricyanure de potassium en ferrocyanure. Comme on a soin d'opérer en présence d'un excès de ferricyanure, le dosage se termine par la détermination de cet excès. Pour cela on réduit le ferricyanure restant par l'acide iodhydrique :



Il se produit un dégagement d'iode, que l'on dose par une solution titrée de thiosulfate. On ramène donc le dosage du glucose à celui du ferricyanure disparu. La réaction (I), ainsi

que nous l'avons indiqué ci-dessus, est réversible ; mais elle cesse de l'être et devient complète dans le sens qui nous intéresse si l'acide ferrocyanique est précipité à mesure qu'il se forme, à l'état de sel de zinc, aux dépens du sulfate de zinc que l'on a soin d'ajouter en excès.

Nous avons suivi tous les détails techniques indiqués par A.M. STAUB dans "les techniques de laboratoire" de J. LOISELEUR (25).

III. Courbes d'hydrolyse

Nous opérons sur 2 mg. de polyoside dissous dans 2 cm³ d'acide. L'hydrolyse se fait en ampoules scellées, soit au bain-marie à 100°, soit au four électrique à 110° et à 150°, pendant des temps variables. Comme nous l'avons indiqué plus haut (page 14), il est important, pour la bonne marche du dosage, de neutraliser très exactement les hydrolysats acides. Dans la pratique voici comment nous avons été amenée à opérer : on ajoute à l'hydrolysats refroidi la quantité de soude normale correspondant à l'acide employé, puis quelques centimètres cubes du tampon phosphate pH 7,5 dont la formule a été donnée plus haut (page 14) et on ajuste exactement le pH à 7,5 au moyen d'une solution N de NaOH ou de HCl.

une tubulure
unie par un
Caoutchouc

Pour ajuster le pH, il est commode d'utiliser le dispositif suivant, adapté au pHmètre à électrode de verre de Coleman : la cuve du pHmètre est munie d'une tubulure identique fixée à la base d'un Erlenmeyer. On verse la solution à neutraliser dans l'Erlenmeyer, que l'on élève ensuite à un niveau supérieur à celui de la cuve pour la remplir. Une pince permet de fermer le tuyau de caoutchouc. La mesure faite, on fait redescendre le liquide dans l'Erlenmeyer. On peut ajuster le pH sans perdre de solution.

Le volume est ensuite complété à 25 cm³ avec du tampon. La teneur en sucre de 1 cm³ correspond dans ces conditions à celle de 80 microgrammes du polyoside initial.

B) Identification des sucres par chromatographie

Les sucres que l'on rencontre le plus souvent dans les polyosides microbiens sont de constitutions très voisines, ce qui rend difficile leur identification. En effet, certaines réactions colorées très sensibles permettent de distinguer les aldoses des cétooses, les hexoses des pentoses, etc. ; mais il est difficile de différencier les aldohexoses entre eux par exemple. De plus, là encore, nous devons rechercher des méthodes utilisant le moins possible de produit.

L'application aux sucres de la chromatographie sur papier a permis de résoudre certains problèmes d'identification de sucres jusqu'alors insolubles.

Nous n'exposerons ici ni le principe, ni les détails techniques de cette méthode dont l'usage s'est très vite généralisé. Nous nous sommes rapportée aux articles originaux de PARTRIDGE (30) et à l'étude générale de DEDONDER parue dans "la journée de la chromatographie sur papier"(31).

I) Hydrolyse

Nous avons hydrolysé nos polyosides par une solution normale d'acide sulfurique pendant des temps variables dans un four électrique à 110°. Afin d'obtenir des solutions assez concentrées pour donner de bons chromatogrammes, il faut partir de 12,5 mg. de polyoside dissous dans 2 cm³ de SO₄H₂; on opère en ampoules scellées.

La neutralisation exige certaines précautions, car il faut obtenir un hydrolysats exempt de sel. Nous avons tout d'abord employé la baryte pour neutraliser l'acide sulfurique mais la température ambiante étant trop élevée, nous avons eu des résultats aberrants dus à l'épimérisation des sucres en milieu alcalin : en effet, lors de la neutralisation, à l'endroit où tombe la goutte de baryte, les sucres sont en milieu alcalin pendant un temps très court, mais suffisant pour qu'il se produise une épimérisation lorsque la température ambiante est aux environs de 30°. Nous avons remplacé la baryte par le carbonate de baryum qui ne présente pas le même inconvénient. Les résultats sont bons à condition d'utiliser un carbonate pur (il doit être blanc) ou de le laver soigneusement, sinon les hydrolysats sont alcalins et le même inconvénient peut se produire. Après centrifugation et dessiccation sous vide, le résidu sec est repris dans le minimum d'eau ; sa conservation est assurée par du mercuriure de mercure dont la présence ne gêne pas la chromatographie.

II) Identification des sucres

Chaque fois que cela était possible, nous avons essayé d'amener les solutions à chromatographier à une concentration en sucres de 1 %. On peut ainsi déposer sur la ligne de départ du chromatogramme une seule goutte de liquide, ce qui donne de bien meilleures séparations. Nous utilisons soit des tubes capillaires, soit des pipettes graduées à 2,5 mm³.

Bien que le papier WATMAN N°1 donne les taches les plus nettes et les mieux séparées, les papiers DURUM N° 122 et d'ARCHES N° 302 nous ont donné des résultats satisfaisants dans l'étude qualitative de nos polyosides.

Pour la chromatographie ascendante notre cuve était constituée par deux bords cylindriques (14 cm. de diamètre 24 cm. de hauteur) dont les deux ouvertures étaient jointes par du sparadrap. Le chromatogramme était mis dans la cuve avec le solvant qu'on laissait monter jusqu'au haut du papier.

Pour la chromatographie en écoulement continu nos cuves étaient constituées par un parallélépipède en bois (50 x 30 x 90 cm.) dont les deux grandes faces étaient remplacées par des vitres hermétiquement encastrées dans le bois. Le bois était rendu étanche au moyen de plusieurs couches de paraffine. Le couvercle supérieur, dans lequel était ménagé un trou pour le remplissage, était fixé sur la cuve par une bande adhésive. Nous avons toujours laissé le papier 24 h. dans la cuve saturée par les vapeurs des constituants du solvant. On introduisait ensuite le solvant dans la cuve par le trou du couvercle. Il est indispensable que l'enceinte soit parfaitement étanche et que cuve et papier soient horizontaux.

La vitesse d'écoulement du solvant dépend beaucoup de la température. Malheureusement, il nous fut impossible de travailler dans une chambre à température constante : mais si l'on a soin de toujours chromatographier avec l'hydrolysé un mélange connu des divers sucres étalons, on n'est pas gêné par les variations de température.

Les solvants utilisés varient selon la nature des sucres à séparer. Nous avons utilisé pour la chromatographie ascendante 2 solvants indiqués par PARTRIDGE (32) :

I	(butanol redistillé	40 p. 100
	(acide acétique	10 p. 100
	(eau	50 p. 100

II phénol saturé d'eau

Pour la chromatographie avec écoulement continu du solvant, selon la technique de JERMYN et ISHERWOOD (33), nous avons choisi des solvants capables de séparer les glucose, mannose et galactose :

(pyridine	2 vol.
(acétate d'éthyle	5 vol.
(eau	5 vol.
(acétate d'éthyle	1 vol.
(acide acétique	3 vol.
(eau	3 vol.

avec ce dernier solvant le R_F du mannose est assez éloigné de ceux du galactose et du glucose.

Nous avons utilisé différents révélateurs (31) :

1) Le phtalate acide d'aniline colore les aldoses et non les cétooses (ou très peu). Les pentoses sont rouges, les méthyl-pentoses grisâtres et les hexoses marrons.

(aniline	0,93 g.
(acide phtalique	1,66 g.
(butanol saturé d'eau Q.S.P.	100 cm ³

2) L'urée est un excellent révélateur des cétooses. Utilisé après le phtalate d'aniline, il renforce son action et permet de révéler cétooses et aldoses sur le même chromatogramme:

(urée	5 g.
(HCl 2 N	20 ml.
(éthanol	80 ml.

3) Le naphtorésorcinol différencie les acides uroniques colorés en bleu à la température ordinaire, des cétohexoses colorés en rouge et des pentoses et méthylpentoses colorés en bleu-violet à 75°.

(naphtorésorcinol	100 mg.
(HCl 2 N	20 cm ³
(éthanol Q.S.P.	100 cm ³

4) Le réactif d'ELSON et MORGAN révèle les hexosamines.

(1) acétyl-acétone 0,5 cm³ dans 50 cm³ de butanol
 (2) KOH à 50% 5 cm³ dans 20 cm³ d'éthanol
 0,5 cm³ de (2) sont mélangés à 10 cm³ de (1) juste avant l'emploi.

On pulvérise cette solution sur la feuille. On porte 5 minutes à 105°, on révèle ensuite avec :

(diméthyl-para-amino-benzaldéhyde	1 g.
(éthanol	30 cm ³
(HCl	30 cm ³
(butanol	280 cm ³

Après cinq minutes à 90°, les hexosamines sont rouge cerise, la N acétylglucosamine pourpre-violet.

5) Une solution de 5 mg. de bromo-phénol dans 100 cm³ d'alcool à 95° permet d'identifier les acides.

Les R_F des taches obtenues comparés à ceux des mélanges étalons déposés sur le même chromatogramme nous ont suffi pour identifier les sucres déjà trouvés par FREEMAN. Par contre pour l'identification des taches nouvelles, cette simple comparaison n'était pas suffisante. Nous avons identifié les sucres inconnus révélés par le chromatogramme en ajoutant divers sucres à l'hydrolysate et en constatant que l'un d'eux migrait avec la tache que nous voulions identifier.

C) Dosage des sucres par chromatographie

I) Choix d'une méthode

Après avoir identifié les sucres des polysides typhiques, il nous restait à doser chacun d'entre eux. Le dosage des différents sucres d'un mélange est toujours plus difficile que leur identification. Les fermentations sélectives, qui avaient donné quelque espoir, n'ont en effet guère trouvé d'application que pour les dosages du glucose (avec la notatine) et du galactose (avec des levures sélectives). FREEMAN (15-16), YOKOYAMA (18) et ELKIN (17) qui étudièrent les polysides des Salmonelles, utilisèrent les hydrazones avec ou sans fermentation sélective préalable. Cette technique présente plusieurs désavantages : elle nécessite de grandes quantités de sucres, donc de polysides, elle ne fournit que des résultats relatifs puisque YOKOYAMA doit corriger ses résultats par un coefficient empirique. La précision et la rapidité de l'identification des sucres par la méthode de la chromatographie permettaient d'espérer qu'elle pouvait apporter une solution au problème du microdosage des sucres dans un mélange, et les essais d'utilisation de la méthode à cette fin ont fait l'objet de nombreuses publications pendant ces dernières années.

Les auteurs ont essayé de déterminer les rapports entre la concentration en sucres et :

- soit la mesure de la surface ou de la couleur des taches révélées sur le papier,

- soit la mesure de la couleur de l'éluat de la tache révélée,

- soit le dosage du sucre dans l'éluat de la tache avant révélation.

Examinons les résultats obtenus par ces trois méthodes :

a) Les travaux de Mc FARREN (34) sont consacrés à la mise au point de la première méthode. Cet auteur mesure au photo-colorimètre le maximum d'absorption des taches révélées au nitrate d'argent. Il fut le premier à doser le glucose et le galactose qui se séparent très difficilement sur les chromatogrammes. La précision obtenue est de l'ordre de 10%, encore faut-il être sûr que la révélation est faite de façon uniforme sur toute la surface du chromatogramme.

b) WALLENFELS (35) élue les taches de sucres révélées au chlorure de triphényl-tétrazolium. Le formazan, produit en présence de sucre, est extrait par la pyridine et dosé par

colorimétrie. Cette méthode, comme celle de Mc FARREN (34) permet de doser des sucres dont les R_F sont voisins. Elle a été appliquée tout dernièrement par WESTPHAL (36) au dosage des sucres du polyoside pyrogène de *Bacterium coli* qui contient du glucose, du galactose, du rhamnose et du xylose.

c) Enfin au troisième groupe se rattachent les travaux de l'école de HIRST : la tache est localisée sans être révélée à l'aide d'une bande témoin découpée sur le chromatogramme et révélée. Le sucre est alors élué puis dosé par une microméthode. HIRST et ses collaborateurs ont utilisé la méthode de SOMOGYI (37) et, pour les sucres méthylés, une méthode à l'hypoiodite (38). Ensuite pour éviter les inconvénients de ces méthodes qui sont très délicates, ces auteurs ont essayé de doser les sucres (sauf les sucres méthylés) par oxydation par le periodate et dosage de l'acide formique produit (39). La précision de ces méthodes est de 5 à 10 p. cent si les sucres sont bien séparés.

Dans le même groupe nous indiquerons la méthode de MACHEBOEUF et BLASS (40) qui éluent le sucre dans le méthanol, puis le dosent colorimétriquement par le phtalate d'aniline.

Nous avons choisi la méthode de DUBOIS et SMITH (41) à cause de sa simplicité. Elle consiste en effet à doser les sucres par la réaction colorée qu'ils donnent en présence d'acide sulfurique concentré et de phénol. Son emploi est particulièrement recommandé lorsque les sucres à doser se séparent dans le phénol, utilisé comme solvant de chromatographie. En effet, la principale difficulté des dosages après chromatographie provient de la présence de traces de solvant qui gênent les réactions. C'est ce qui faisait l'originalité de la méthode initiale. Dans la suite SMITH (42) l'a appliquée à des chromatogrammes utilisant d'autres solvants que le phénol, ce qui nous a incitée à l'employer ; mais nous n'avons obtenu des résultats lisibles qu'après de nombreuses mises au point relatées dans la suite de ce chapitre.

II) Mise au point du dosage d'après la méthode de DUBOIS-SMITH

Dosage sans chromatographie

Technique.

On mesure dans une série de tubes exactement de même épaisseur (pour qu'on puisse faire la mesure au photomètre dans les tubes mêmes) 0,05 cm³ d'une solution de 80 p. cent de phénol, ensuite 3 cm³ de la solution sucrée et lentement, tout en agitant 5 cm³ d'acide sulfurique concentré (65° Bé). La couleur jaune orange se développe en quelques secondes. Lorsque le mélange est revenu à la t° du laboratoire (après environ 30 minutes) on fait les lectures au photomètre. Nous utilisons un photomètre de

de BONET-MAURY à réseau à la longueur d'onde de 480 millimicrons (filtre bleu).

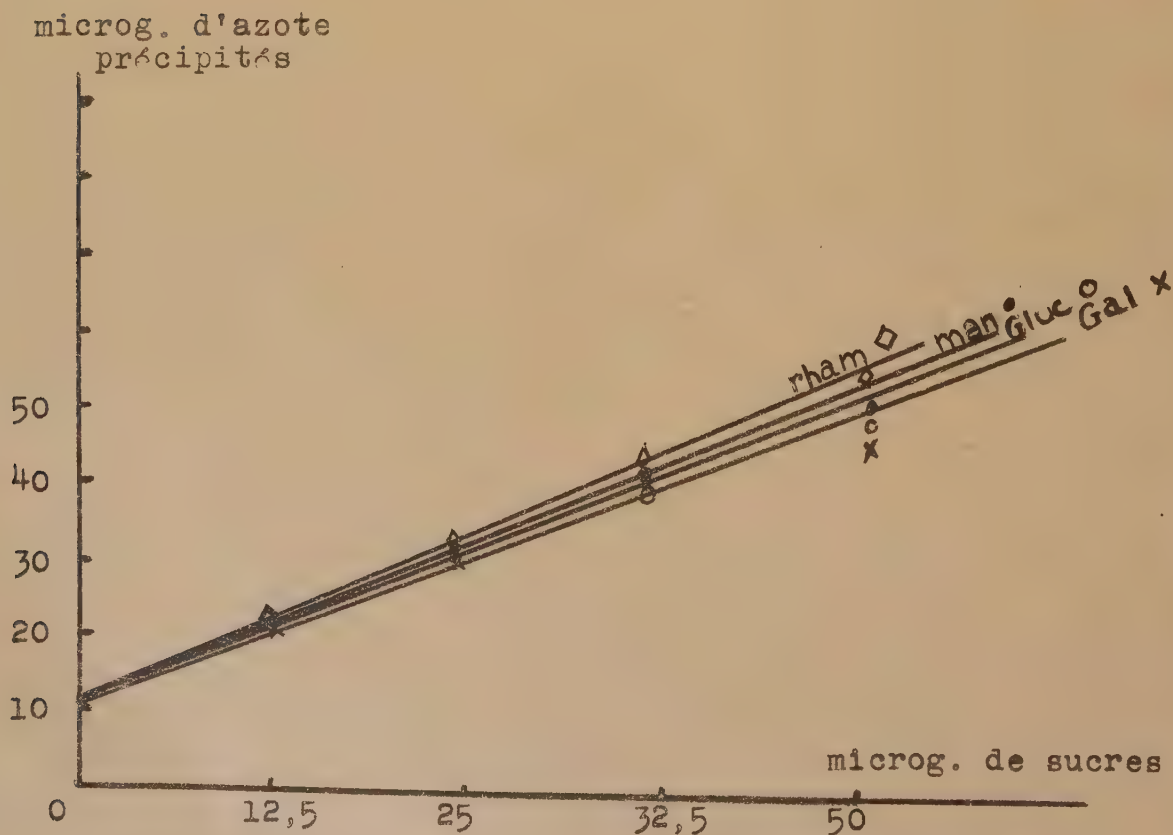
La couleur est parfaitement stable pendant plusieurs heures. Le rhamnose donne une teinte différente de celle fournie par les glucose, mannose et galactose, quoique le maximum d'absorption soit à la longueur d'onde de 480 millimicrons pour tous ces sucres.

En dosant des quantités croissantes de sucres, les points obtenus se rangent sur des droites. Les courbes témoins de glucose, mannose, galactose sont un peu différentes (figure 2).

FIGURE 2

Dosage des glucose, mannose, galactose et rhamnose
par la méthode de DUBOIS-SMITH

Variation de la densité optique en fonction de la
concentration en sucre.



Le dosage des sucres par la méthode de DUBOIS-SMITH exige des réactifs très purs. Le phénol utilisé doit être redistillé et parfaitement incolore au moment de l'emploi. L'acide sulfurique, s'il n'est pas complètement pur, donne des "blancs" colorés en mauve, ou des points aberrants rendant les résultats illisibles. Il est indispensable d'essayer chaque nouveau flacon utilisé. Nous avons eu les meilleurs résultats avec l'acide sulfurique "procédé Bertrand" de Prolabo qui est exempt d'arsenic.

Même en employant des réactifs purs, nous avons parfois eu des points aberrants. Pensant qu'il s'agissait peut-être de variations dans la température de la réaction, nous avons essayé de plonger nos tubes dans un bain-marie. Lorsqu'on mélange l'acide sulfurique à la solution sucrée, la température atteint 115°-120° pendant quelques secondes, puis s'abaisse, tandis qu'apparaît la coloration. Les résultats n'ont pas été améliorés en plongeant les tubes pendant 30 secondes dans un bain d'huile maintenu à 120° exactement, puis dans la glace fondante. Finalement, les meilleurs résultats ont été obtenus en suivant les directives exactes données plus haut.

Hydrolyse.

Nous avons déjà étudié la technique d'hydrolyse des polyosides en vue de l'identification des sucres par chromatographie. Les difficultés sont plus grandes lorsqu'il s'agit de chromatographie quantitative, car il faut être sûr qu'au cours de la neutralisation, on n'a pas perdu de sucres.

Nous avons neutralisé les hydrolysats par le carbonate de baryum jusqu'au jour où nous nous sommes aperçue que la somme des sucres dosés dans le polyoside était très loin de la quantité de produit que nous avions mise en oeuvre. Même avec de très grandes précautions (quantité minimum de carbonate de baryum, lavages répétés) nous n'arrivons pas à retrouver tout le sucre de solutions connues que nous avons traitées comme un hydrolysats de polyoside. De plus, les pertes en glucose, mannose et galactose ne sont pas identiques.

HIRST et son école (43) ont dû rencontrer des difficultés semblables en neutralisant avec le carbonate de baryum puisqu'ils ajoutent à leur hydrolysats, avant neutralisation, une quantité connue d'un sucre qui n'existe pas dans le produit à analyser et qui servira de référence. Il nous était difficile de suivre cette technique pour le dosage des glucose, mannose et galactose, car nous devions chercher un sucre dont le R_F soit très différent de celui des nôtres. Or pour séparer suffisamment nos trois sucres, nous devons les faire migrer le plus longtemps possible; à ce moment là les sucres de plus grand R_F ont coulé plus loin que le bord du chromatogramme et sont perdus; il n'existe pas de sucre qu'on puisse utiliser comme référence dont le R_F soit plus petit que ceux du groupe du glucose.

Nous avons alors essayé de neutraliser les hydrolysats de polyoside à l'aide d'un échangeur d'ions. La permutite A 300 D de PHILLIPS et PAIN nous a donné entière satisfaction. Après 18 heures

de séjour dans l'eau distillée, la permutite est traitée par une solution à 5% de soude, puis lavée par un courant d'eau distillée jusqu'à ce qu'elle soit neutre. Elle est alors prête à être employée. Des solutions connues des différents sucres que nous avons à doser ont été traitées, comme les polyosides, par la solution normale d'acide sulfurique puis neutralisées par la permutite. 30 minutes de contact avec la permutite suffisent à neutraliser l'hydrolysât ; après vérification du pH, on filtre l'hydrolysât sur verre fritté en s'aidant d'un léger vide. La permutite doit être lavée de nombreuses fois. Nous faisons habituellement 6 lavages avec quelques centimètres cubes d'eau, ensuite nous laissons la permutite une nuit à la glacière dans l'eau. Après deux autres lavages, la permutite ne contient plus de sucres. C'est ce que nous avons vérifié en dosant les sucres des solutions témoins : nous retrouvons exactement la quantité de sucre que nous avons mise en expérience.

Pour le dosage des sucres des polyosides nous opérons sur 10 mg. de poudre dissoute dans 2 cm³ d'une solution normale d'acide sulfurique. Après 6 heures au four à 110°, l'ampoule est refroidie et son contenu transvasé dans un bécher contenant 1 à 2 g. de permutite. On agite à plusieurs reprises pendant 30 minutes, on filtre et on procède aux lavages, comme nous venons de l'indiquer. Il est commode de concentrer la solution obtenue par lyophilisation. La dessiccation sous vide en présence d'anhydride phosphorique est plus longue. Nous reprenons le résidu sec par 0,25 cm³ d'eau bidistillée contenant 1 p. 10.000 de merthiolate.

Séparation des sucres sur le chromatogramme et élution.

Tous nos essais de chromatographie quantitative ont été faits sur papier WATMAN N° 1. Nous faisons migrer sur le chromatogramme les solutions à doser et les étalons en mettant les gouttes à 4 cm. de distance sur la ligne de départ. Nous découpons et révélons les chromatogrammes des deux gouttes placées à chaque extrémité, ce qui nous permet de déduire la position des sucres contenus dans les taches identiques déposées sur le papier, en traçant sur le papier des droites passant entre les taches révélées sur les deux chromatogrammes témoins. Nous découpons des carrés de papier contenant chacun des sucres séparés.

L'élution du sucre est faite de façon très simple: il suffit de laisser le carré de papier dans un volume exactement mesuré d'eau bidistillée froide en l'exprimant doucement avec un agitateur à plusieurs reprises. Après 15 minutes, on filtre sur verre fritté pour éliminer les morceaux de papier. Ce procédé d'élution très simple est possible car le dosage est effectué sur une partie aliquote de l'éluat.

Choix d'un solvant

La séparation du rhamnose des autres sucres du polyoside ne présente aucune difficulté. Nous avons pu utiliser en chromatographie ascendante le phénol redistillé saturé d'eau, ce qui simplifiait le dosage par la méthode de DUBOIS-SMITH (41).

Par contre, la séparation des trois autres sucres du polyoside (glucose, mannose et galactose) est beaucoup plus difficile, surtout si l'on veut pouvoir les éluer sans les révéler, ce qui demande une très bonne séparation. Les auteurs ayant étudié les dosages des sucres par élution après chromatographie ne dosent jamais ces trois sucres ensemble car leurs R_F sont trop voisins dans les solvants habituels.

Nous avons essayé différents solvants : le phénol sépare le glucose dont le R_F est inférieur à celui du galactose avec ce solvant, alors qu'il est compris entre les R_F du galactose et du mannose avec les autres solvants, mais les chromatogrammes développés dans le phénol présentent toujours des traînées entre les sucres voisins. Nous avons dû abandonner ce solvant.

Le solvant pyridine-acétate d'éthyle qui nous a permis d'identifier les trois sucres ne les sépare pas assez pour le dosage.

Le butanol saturé d'eau employé à 17° sépare bien le galactose, mais le glucose et le mannose sont à peu près confondus.

Par contre, le solvant indiqué par CHARGAFF et LEVINE (44) (butanol-pyridine-eau) sépare les trois sucres de façon satisfaisante. LUDERITZ et WESTPHAL (36) ont utilisé un solvant de formule à peu près identique. Nous avons essayé d'améliorer la séparation en faisant varier la concentration des constituants du mélange (tableau III).

Le solvant ainsi modifié : butanol 3 vol., pyridine 4 vol., eau 2 vol., nous permet d'isoler nos trois sucres suffisamment pour les éluer. Nous développons les chromatogrammes pendant 50 à 60 heures selon la température. A chaque dosage après avoir découpé les carrés de papier contenant les taches, nous révélons les alentours pour nous assurer que toute la tache a été atteinte.

TABLEAU III

Séparation des glucose, mannose et galactose

		Chemin parcouru par			Séparation	
		galactose	glucose	mannose		
CHARGAFF & LEVINE:						
butanol	3	:	:	:	:	
pyridine	2	:	:	:	:	
eau	1,5	20 cm.	22,5 cm.	22,5 cm.	:	
couche supérieure:		:	:	:	taches	
+ pyridine	1	:	:	:	nettes	
		:	:	:	migration	
		:	:	:	lente	
LUDERITZ & WESTPHAL						
butanol	3	:	:	:	:	
pyridine	2	20 cm.	22,5 cm.	26 cm.	:	
eau	1,5	:	:	:	:	
1ers essais						
butanol	2	/	/	/	traînées	
pyridine	3	/	/	/	:	
eau	0,5	:	:	:	quantité	
		:	:	:	d'eau	
2èmes essais						
butanol	3	/	/	/	insuffi-	
pyridine	3	/	/	/	sante	
eau	1	:	:	:	:	
Formule adoptée						
butanol	3	:	:	:	taches	
pyridine	4	20 cm.	23 cm.	26,5 cm.	nettes	
eau	2	:	:	:	migration	
		:	:	:	plus	
		:	:	:	rapide	

Selon la concentration des constituants du solvant la séparation est plus ou moins satisfaisante.

Dosage après chromatographie

Si le chromatogramme a été développé dans le phénol (pour le rhamnose), il suffit de sécher le papier à l'air avant de procéder à l'élution.

Par contre le dosage après chromatographie au solvant butanol-pyridine est impossible si l'on se contente de sécher le papier même longtemps à l'air. Est-ce la présence de restes de solvant qui gêne le dosage ? 25 microgrammes de butanol ajoutés dans les tubes à réaction ne perturbent pas le dosage. La quantité de butanol retenue sur le papier n'excede pas cette quantité. Le solvant lui-même (butanol-pyridine eau) ajouté dans les mêmes proportions, permet également le dosage. Par contre, la courbe obtenue après chromatographie du sucre comporte de nombreux points aberrants, ce qui ne se produisait pas lors du dosage du rhamnose après migration dans le phénol. Il semble donc que le solvant, qui n'a aucune action lorsqu'il est ajouté dans les tubes, gêne la réaction lorsqu'il est en présence du papier. SMITH (42) a réussi des dosages après chromatographie dans le butanol, mais il n'a jamais utilisé le solvant butanol-pyridine. Il nous fallait donc éliminer le solvant après la migration, dès la sortie de la cuve à chromatographie pour éviter qu'il ne réagisse sur le papier au contact de l'air. Nous avons essayé divers liquides organiques capables de dissoudre rapidement le butanol et la pyridine. Après avoir obtenu d'excellents résultats avec un lot d'éther de pétrole, il nous fut impossible de les reproduire dans la suite (tableau IV et figure 3). Aussi décevants furent les résultats obtenus avec un hexane purifié qui se révéla d'ailleurs par la suite, contenir de nombreuses impuretés.

Finalement nous avons essayé l'éther sulfurique déshydraté par Cl_2Ca , puis sodium et redistillé, 48 heures au plus, avant usage. Ce procédé avait été utilisé par CUENDET (45), en chromatographie qualitative, mais pas encore jusqu'ici en chromatographie quantitative. Nous nous sommes donc assurée dans un premier temps que le lavage des taches par l'éther laissait intactes les quantités de sucres. La figure 4 montre en effet que les points fournis par les taches lavées à l'éther ou non sont bien tous sur une même droite. Malheureusement le lavage des papiers dans trois bains d'éther supprime bien toute trace de butanol, mais laisse toujours une petite quantité de pyridine très facilement décelable à l'odorat. C'est sans doute ce reste de pyridine qui perturbe encore les dosages effectués sur les papiers ainsi lavés. On arrive à l'éliminer lorsqu'on place les papiers lavés à l'éther et secs dans une cloche à vide contenant du Cl_2Ca . Au bout de quelques heures le papier ne conserve plus aucune odeur de pyridine et les dosages sont alors satisfaisants (tableau V et figure 5).

Dans la pratique voici exactement comment sont dosés les sucres des polyosides.

Nous préparons à la fois 2 chromatogrammes qui sont développés dans la même cuve. Sur chacun d'eux nous déposons 8 taches distantes l'une de l'autre de 4 cm. et contenant respectivement :

- | | | | | | |
|-----|---|--------------------------|--------|----------------------|------------------|
| 1°) | 5 mm ³ | de l'hydrolysats à doser | | | |
| 2°) | 10 mm ³ | " | | (1er chromatogramme) | ou |
| | 7,5 mm ³ | (2e chromatogramme) | | | |
| 3°) | 20 µg. | de glucose et | 20 µg | de rhamnose | (1er chromatog.) |
| ou | 40 µg. | " | 40 µg | " | (2e ") |
| 4°) | 60 µg. | " | 60 µg | " | (1er ") |
| ou | 80 µg. | " | 80 µg | " | (2e ") |
| 5°) | 20 µg. | de mannose et | 20 µg. | de galactose | (1er ") |
| ou | 40 µg. | " | 40 µg. | " | (2e ") |
| 6°) | 60 µg. | " | 60 µg. | " | (1er ") |
| ou | 80 µg. | " | 80 µg. | " | (2e ") |
| 7°) | et 8°) environ 5 mm ³ de l'hydrolysats : ces deux taches seront révélées et serviront de repère. | | | | |

Les taches 3 et 4 des deux chromatogrammes permettent d'établir les droites étalons des glucose et rhamnose (20, 40, 60, 80 µg.) de même les taches 5 et 6 permettent d'établir les droites étalons des galactose et mannose. Ces droites varient peu d'un chromatogramme à l'autre lorsqu'on utilise les mêmes réactifs ; mais il est plus prudent de les établir chaque fois, comme le conseille WESTPHAL (36) qui utilise la technique de WALLENFELS (35)

Après migration pendant 50 à 60 heures (suivant la température ambiante) dès la sortie de la cuve, les chromatogrammes sont lavés 3 fois dans l'éther anhydre récemment distillé, puis laissés sous vide en présence de chlorure de calcium pendant une nuit. Après révélation des taches "témoins" et découpage des taches comme indiqué plus haut (page 24), les sucres sont élués. L'éluat est filtré sur verre fritté sous une légère pression à l'aide d'un dispositif ad hoc. Le dosage est effectué sur 3 cm³ des éluats. (Cf. page 21).

En opérant de cette façon nous effectuons les dosages sur 4 taches contenant 3 quantités différentes de polyoside, ce qui permet de lire plus facilement sur les droites étalons; nous pouvons ainsi éliminer les points aberrants éventuels toujours possibles dans ces genres de dosage.

TABLEAU IV

Résultats obtenus par la méthode de SMITH-DUBOIS adaptée au dosage des glucose, mannose, galactose. Chromatogrammes lavés à l'éther de pétrole.

		1er essai	2e essai	3e essai			
Galactose	microgrammes déposés	50	50	50	50	25	50
	microgrammes dosés	50	50	37	40	40	49
Glucose	microgrammes déposés	50	50	25	50	50	100
	microgrammes dosés	49	53	30	50	56	97
Mannose	microgrammes déposés	50	50	50	50	50	100
	microgrammes dosés	50	48	50	48	52	102

Voir sur la figure 3 la courbe témoin obtenue à chacun des trois essais. (Elle est identique pour les trois sucres et aux différents essais).

Sur 18 dosages, 14 ont fourni exactement les quantités de sucre déposées sur le papier.

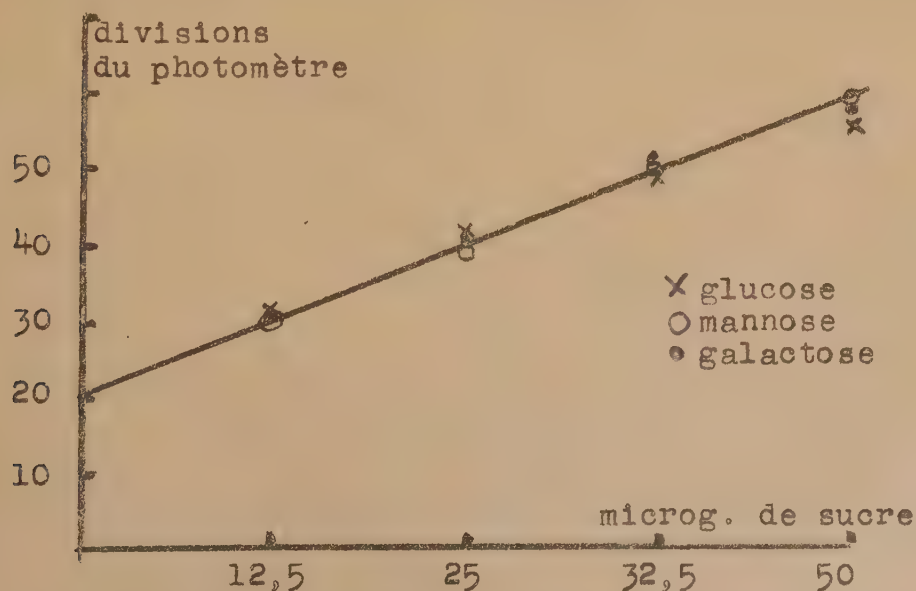


FIGURE 3. Variation de la densité optique en fonction de la concentration en sucre.

TABLEAU V

Résultats obtenus par la méthode de DUBOIS-SMITH adaptée au dosage des glucose, mannose, galactose. Chromatogrammes lavés à l'éther de pétrole.

Technique mise au point

Galactose	microgrammes déposés	40	20
	microgrammes dosés	40	21
Glucose	microgrammes déposés	40	20
	microgrammes dosés	41	19
Mannose	microgrammes déposés	40	20
	microgrammes dosés	39	18

Voir sur la figure 5 la courbe témoin obtenue pour cet essai et pour les dosages des sucres des polyosides.

Les résultats sont satisfaisants.

Divisions du photomètre

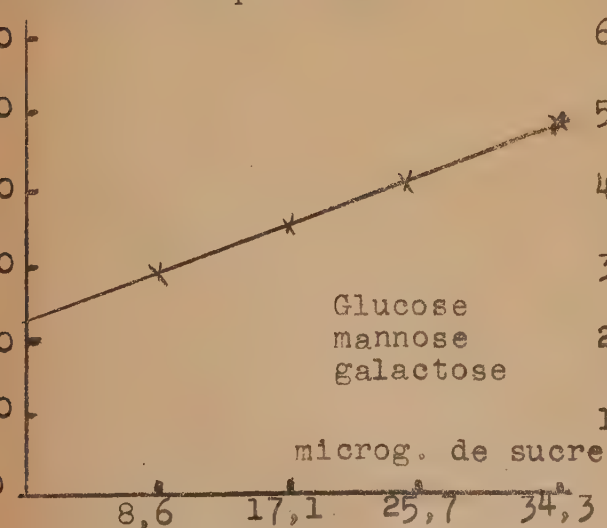


FIGURE 5

Technique mise au point
Courbe témoin obtenue à tous les essais.

divisions du photomètre

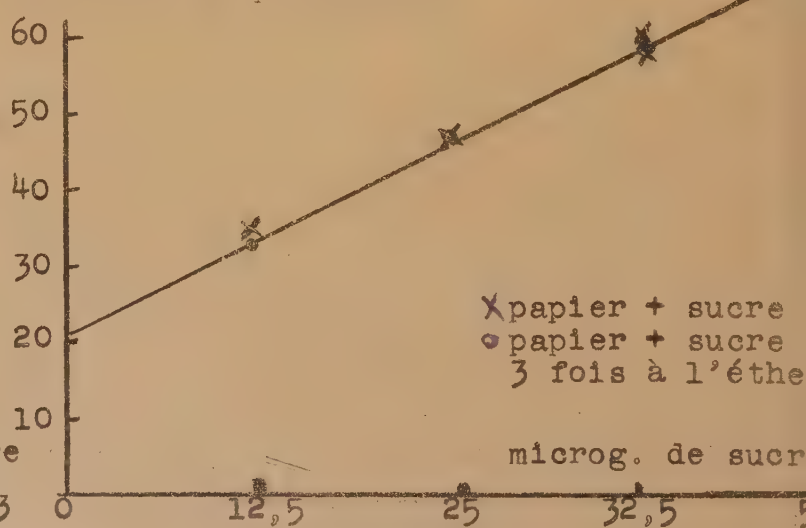


FIGURE 4

Le lavage des chromatogrammes à l'éther anhydre ne provoque pas de perte de sucre et ne gêne pas le dosage.

CHAPITRE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons appliqué les méthodes décrites dans le chapitre précédent à l'analyse des différents polyosides que nous voulions comparer :

le polyoside typhique(x) dont nous avons trois échantillons : l'un extrait des bacilles de la souche O 901, les deux autres préparés à partir des cultures de la souche T 50-5 faites à un an d'intervalle environ (T 50-5 I. T 50-5 II) (T)

le polyoside paratyphique B (B)

le polyoside typhi murium (T.M.)

Puisque notre but était de comparer les divers polyosides entre eux, nous avons groupé les résultats obtenus en utilisant les diverses méthodes. Nous avons également tenu compte des résultats obtenus par FREEMAN (15-16) qui étudia les polyosides typhique (Ty2) et Typhi murium préparés exactement comme les nôtres.

Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire, comme l'indique le tableau VI, donne des résultats très voisins pour toutes les préparations de polyoside. Ces résultats sont d'ailleurs les mêmes que ceux obtenus par FREEMAN, à partir des bacilles de la souche de S. Typhi Ty2 et S. typhi murium. Le rapport des poids de carbone et d'hydrogène est identique à celui d'un hexose. Les variations du taux d'azote, qui reste toujours très faible pour les polyosides O 901, T 50-5 et para B (inférieur à 0,5 %), font songer à la présence de quelque impureté protidique dans ces préparations. Le taux de 1,12 % trouvé primitivement dans la préparation du polyoside extrait de Styphi murium nous a incitée à essayer des purifications plus poussées:

1) Nous avons d'abord fait une nouvelle précipitation acétique en essayant d'ajouter le minimum d'acide : le polyoside ne précipite en solution acétique qu'à partir de 96 % d'acide. Après 3 précipitations alcooliques et les lavages habituels à l'alcool et à l'éther, le polyoside contient encore 0,9 % d'azote.

(x) Une partie des résultats fournis par l'analyse de ce polyoside a déjà fait l'objet d'une communication à la Société de Chimie biologique (PON et STAUB 46 a).

2) Ensuite nous avons essayé la méthode de purification par agitation avec du chloroforme et de l'alcool butylique qu'indique SEVAG (46) : on prépare le mélange suivant :

(polyoside dissous dans 10 cm ³ d'eau	50 mg.
(acide acétique glacial	0,2 cm ³
(acétate de sodium	0,4 g.
(butanol redistillé	0,4 cm ³
(chloroforme	2 cm ³

Après une agitation mécanique de trente minutes et une centrifugation de 10 minutes, les impuretés protéidiques se rassemblent à la surface de séparation de la couche aqueuse et de la couche chloroformique. La partie aqueuse est séparée et traitée une autre fois de la même façon en ajoutant :

(chloroforme	0,4 cm ³
(butanol	0,4 cm ³

On recommence cette opération jusqu'à la disparition complète des impuretés. Trois épuisements ont suffi. Le polyoside, reprécipité trois fois à l'alcool et lavé comme d'habitude, contient encore 0,8 % d'azote.

3) Enfin connaissant les bons résultats obtenus par MORGAN (47) avec la méthode qu'il a employée pour purifier la substance H du sérum humain, nous avons essayé de précipiter à diverses concentrations d'alcool la solution phénolique (phénol 92 %) de notre polyoside. Une fraction précipite avec 35 % d'alcool, une autre avec 37,5 % : toutes deux contiennent encore 1 % d'azote.

L'azote du polyoside T.M. est donc solidement fixé sur la molécule puisqu'il résiste à tous les essais de purification que nous avons tentés.

Dosage de la glucosamine

Nous avons cherché si les faibles quantités d'azote présentes dans les différents polyosides pouvaient être dues à la présence de glucosamine.

20 mg. de polyoside sont hydrolysés dans 10 cm³ de solution normale d'acide chlorhydrique pendant 2, 4 et 8 heures d'ébullition à reflux. Le volume est alors amené à 25 cm³ avec de l'eau distillée et la glucosamine est dosée par la méthode d'ELSON et MORGAN (23), comme nous l'avons indiqué (p. 11) au chapitre précédent.

TABLEAU VI
Analyse élémentaire des polyosides

Elément dosé	Polyoside O 901	Polyoside T 50-5	Polyoside Ty2 FREEMAN	Polyoside para B	Polyoside T.M.	Polyoside T.M. FREEMAN
C	41,4	45,4	44-48	35-39 ⁺⁺	40	45
H	6,6	5,98	7,04	7,7-5,5 ⁺⁺	7	6,8
P	0,9	0,9	0,4-0,9	0,5	1	-
S	0	0	0	0	1	0
N	0,37	0,17-0,43 ⁺	0,4	0,5	1	0
cendres	3,3	2,45	2	1,33	-	-

Résultats exprimés en grammes pour 100 grammes de polyoside.

+ Les deux préparations de polyoside typhique n'ont pas le même taux d'azote.

++ Les deux chiffres nous ont été fournis par deux analyses successives de la même préparation.

TABLEAU VII
Dosage de la glucosamine dans les polyosides

Polyoside	N %	Microg. de glucosamine libérés par 750 mg. de polyoside (1 cm. ³ d'hydrolysat) après			%	N% dû à la glucosamine
		2 h. d'hydrolyse	4 h. d'hydrolyse	8 h. d'hydrolyse		
O 901	0,37	-	13,5	11	1,7	0,13
T 50-5 I	0,17	-	12	10,5	1,5	0,12
T 50-5 II	0,43	traces	traces	traces	-	0
B	0,5	traces	traces	traces	-	0
T.M.	1	-	20	20	2,16	0,17

La quantité maximum de glucosamine est dosée après 4 heures d'hydrolyse. Sauf pour le polyoside T 50-5 I (1ère préparation), le pourcentage d'azote des polyosides ne peut être justifié par leur teneur en glucosamine.

Les résultats consignés dans le tableau VII montrent que lorsque la glucosamine est présente, c'est en petite quantité. En outre la lecture des colonnes 2 et 7 indique immédiatement que si le taux d'azote du polyoside T 50-5 ^{pas} peut être justifié par sa teneur en glucosamine, il n'en est ^{pas} de même avec ~~culture~~ ^{autres} des autres préparations, notamment avec le polyoside T.M. particulièrement riche en azote.

Recherche des protéines

Nous avons recherché les protéines dans nos polyosides par la réaction du biuret selon la micro-technique indiquée par FLEURY et EBERHARD (48a). Les traces de protéines que l'on détecte ne correspondent pas à la teneur en azote.

Dosage des radicaux acétylés

Au cours de la purification du polyoside, on est obligé d'aider les dernières précipitations alcooliques par l'addition d'une petite quantité d'acétate de sodium, qui s'élimine, en principe, lors des lavages à l'alcool, mais dont des traces peuvent subsister. Pour supprimer cette cause d'erreur, nous faisons 3 nouvelles précipitations alcooliques du polyoside, en remplaçant l'acétate de sodium par l'acétate de magnésium qui est beaucoup plus soluble dans l'alcool. Les deuxième et troisième précipitations peuvent se faire sans adjonction de sel. Nous lavons ensuite le polyoside trois fois à l'alcool et trois fois à l'éther anhydre. Dans ces conditions il ne reste plus d'acétate.

Un dosage préliminaire nous a assurée que les polyosides ne contenaient pas d'acide acétique libre.

Tenant compte des temps d'hydrolyse indiqués par TABONE (26) dans l'étude des radicaux acétylés du sérum, nous avons chauffé à 100° pendant 5 heures et demie 150 mg. des différents polyosides. Les deux polyosides typhiques contiennent 2,2 % de radicaux acétylés, le polyoside para B en titre 6,6 % et le polyoside T.M. 5,5 %. FREEMAN a trouvé 3 % de radicaux acétylés dans le polyoside typhique. Ces chiffres sont supérieurs à ce que donneraient d'éventuels radicaux acétylés liés à la glucosamine : en effet l'acétyl-glucosamine contient 30 % d'acétyl. Donc les 1,6 % de glucosamine trouvés dans la préparation de polyoside typhique ne peuvent contenir que 0,51 % d'acétyl, chiffre très inférieur aux 2,2 % trouvés. De plus les 2,2 % du polyoside typhique furent trouvés dans l'échantillon II qui ne contenait pas de glucosamine.

Etudes des courbes d'hydrolyse

Les résultats exposés jusqu'ici prouvent que nos différentes préparations sont bien des polyosides acétylés, légèrement souillés, soit par de la glucosamine, soit par des restes

protéïdiques ou des acides aminés en proportions variables selon les préparations.

TABLEAU VIII

Etude de l'hydrolyse du polyoside typhique

Acides		Température d'hydrolyse			% maximum de sucres réducteurs	Temps requis pour atteindre le maximum
HCl	N		110°		57	6 h.
	2 N		110°		57	6 h.
SO ₄ H ₂	N	110°	110°		37 62 30	2 h. 6 h. 2 h.
	N/2			150°	50	1 h.
	N/10		110°		62	14 h.

Une solution de polyoside est hydrolysée pendant des temps différents et avec les acides chlorhydrique et sulfurique à différentes concentrations afin de rechercher les conditions optima d'hydrolyse.

Il s'agit maintenant de faire l'analyse de la partie glucidique elle-même par l'étude du pouvoir réducteur, ensuite par l'identification et le dosage des différents sucres.

Hydrolyse

L'hydrolyse d'un polyoside ne permet pas d'avoir en solution la totalité des sucres réducteurs. En effet ceux qui apparaissent les premiers, peuvent être détruits avant qu'on ait libéré les liaisons les moins facilement hydrolysables. Nous avons recherché systématiquement les conditions optima d'obtention des sucres. FREEMAN (15-16) a utilisé la solution normale d'acide sulfurique et la solution 2N d'acide chlorhydrique.

Le tableau VIII expose les résultats que nous avons obtenus en faisant varier les concentrations de ces deux acides et les températures. Pour le polyoside typhique, c'est l'hydrolyse par la solution N d'acide sulfurique à 110° pen-

dant 6 heures, qui libère le maximum de sucres. Par contre le polyoside para B est hydrolysé plus complètement par la solution N/2 d'acide sulfurique à 150° pendant une heure.

Courbes d'hydrolyse

Les courbes d'hydrolyse par la solution normale d'acide sulfurique de nos trois préparations de polyoside typhique (O 901 T 50-5 I et II) sont confondues, ce qui apporte un argument en faveur de l'identité des trois préparations (figure 6 A).

On voit que les polyosides n'ont aucun pouvoir réducteur avant l'hydrolyse. La quantité de sucres libérés est assez importante pour être dosée à partir de 30 minutes d'hydrolyse, elle s'accroît ensuite très vite dans les 2 premières heures. Pour les différents polyosides typhiques, le maximum est atteint à 6 heures avec 62 % de sucres réducteurs que l'on retrouve encore à 10 heures. Ensuite la courbe s'abaisse par suite de la destruction des sucres libérés.

Les courbes d'hydrolyse des polyosides para B et Typhi murium (figure 6 B et T.M.) identiques au début à celles du polyoside typhique, sont ensuite différentes : le maximum de sucres n'atteint que 50 % après 10 heures d'hydrolyse pour le polyoside para B (figure 6 B). Les sucres du polyoside T.M. sont beaucoup plus vite libérés : le maximum 51 % est atteint dès 2 heures (figure 6 T.M.).

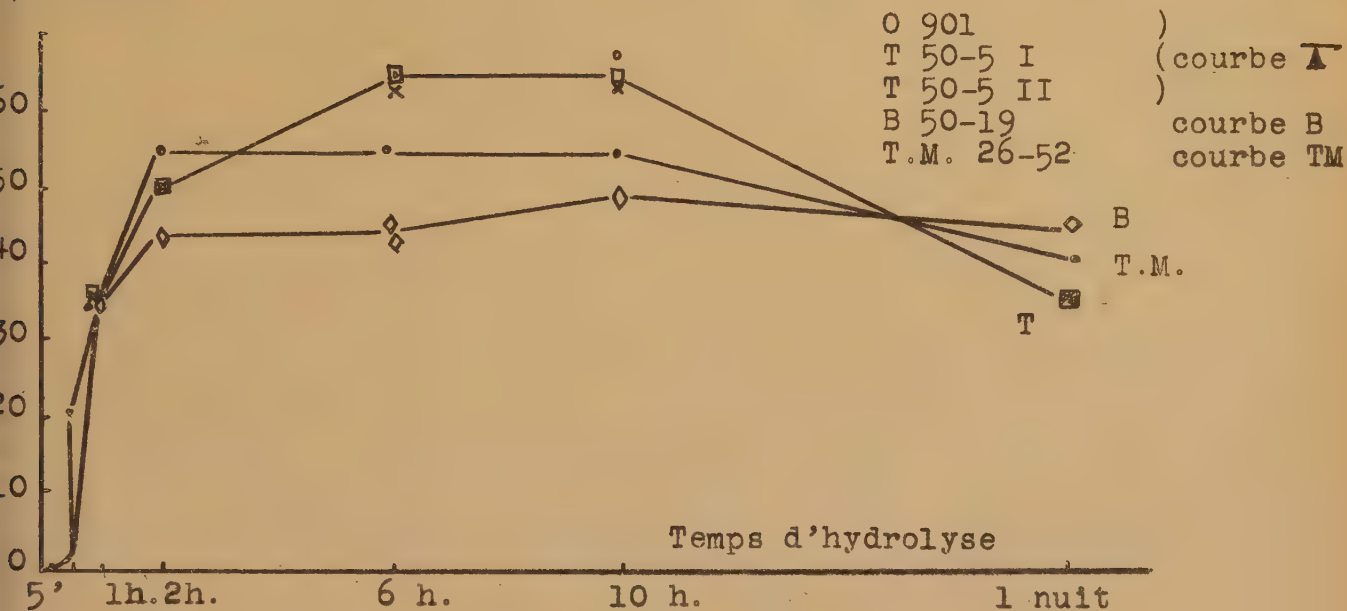
Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par FREEMAN dans l'étude des polyosides Ty2 et Typhi murium. Mais cet auteur utilise la méthode de HAGEDORN-JENSEN (48).

Nous avons dosé par les deux méthodes les sucres réducteurs d'un même hydrolysate de polyoside typhique et de polyoside para B. Les résultats consignés dans le tableau IX montrent qu'avec la méthode de HAGEDORN-JENSEN, le pourcentage de sucres dosés est bien supérieur à celui obtenu avec la méthode de SOMOGYI-NELSON (48-49) ; d'autre part l'équivalence entre ces deux méthodes est la même pour les deux mélanges de sucres qui constituent nos polyosides. La méthode de HAGEDORN-JENSEN fournit dans les deux cas des chiffres égaux à 127 % de ceux fournis par l'autre méthode. Pour comparer nos résultats à ceux de FREEMAN, nous devons donc corriger ceux que nous avons obtenus par la méthode de SOMOGYI-NELSON. Lorsque nous parvenons au sommet de la courbe d'hydrolyse du polyoside typhique, nous obtenons par la méthode de HAGEDORN-JENSEN, 83 % de sucres réducteurs, proportion qu'avait obtenue FREEMAN avec le polyoside Ty2. De même on trouve 70 % pour le polyoside para B et 67 % pour le polyoside Typhi murium. Cependant FREEMAN dose 93 % de sucres réducteurs dans le polyoside typhi murium. Sa préparation ne contient pas d'azote alors que la nôtre en contient 1 p. cent, soit 6 p. cent d'acides aminés ou protides ; mais cela ne suffit

FIGURE 6

Courbes d'hydrolyse des polyosides par une solution normale de SO_4H_2 à 110° .

% Sucres



Variation du pourcentage de sucres réducteurs dosés par la méthode de SOMOGYI-NELSON (rapporté au poids du polyoside) en fonction de la durée, de l'hydrolyse.

TABLEAU IX

Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes de dosages des sucres réducteurs

Hydrolysats étudiés	mg. de sucres réducteurs dosés dans 100 mg. de polyoside		sucres dosés par HAGEDORN-JENSEN
	Méthode de SOMOGYI-NELSON	Méthode de HAGEDORN-JENSEN	sucres dosés par SOMOGYI-NELSON
Polyoside T	60,6	77,2	127
Polyoside B	51,9	66,2	127

pas à expliquer la différence entre nos résultats (67 %) et celui de FREEMAN (93 %) ; en effet même en tenant compte de ce que notre préparation ne contient que 94 % de polyoside, si ce polyoside était identique à celui de FREEMAN, notre préparation contiendrait 87 % de sucres, chiffre bien supérieur au résultat que nous obtenons (67 %).

Il semble donc, dès ces premiers résultats, que notre préparation de polyoside Typhi murium ne soit pas identique à celle obtenue par FREEMAN.

Identification des sucres par chromatographie

I. Chromatographie au cours de l'hydrolyse

Afin de nous assurer qu'au maximum d'hydrolyse, tous les sucres étaient présents, nous avons effectué la chromatographie des hydrolysats sulfuriques ($\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$) obtenus après divers temps de chauffage à 110° ; après neutralisation par le carbonate de baryum, les solutions sont concentrées de façon à contenir dans 1 cm³ les sucres provenant de 50 mg. du polyoside initial. Les chromatogrammes sont développés dans le solvant butanol-acide acétique en chromatographie ascendante pour éviter de laisser échapper les substances migrant vite. Nous avons révélé les chromatogrammes au phtalate d'aniline à $105-110^\circ$. Au cours de l'hydrolyse des polyosides nous voyons apparaître successivement (figure 7) :

1) une tache A, décelable après cinq minutes et s'estompant après six heures d'hydrolyse, dont le R_F ne correspond à celui d'aucun sucre connu.

2) une tache B n'apparaissant qu'après une heure d'hydrolyse et dont le R_F est proche de celui du groupe rhamnose-fucose-ribose-xylose.

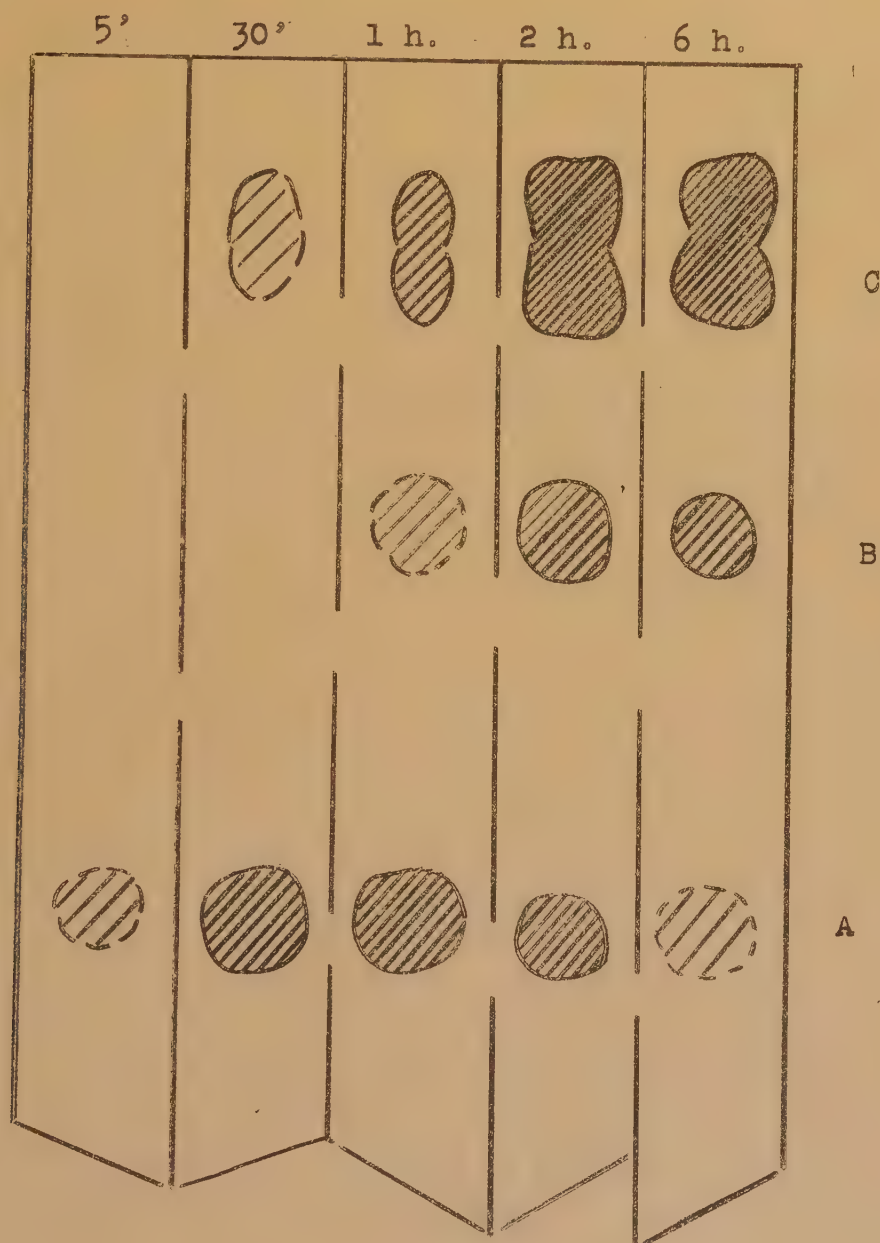
3) une grosse tache C attribuable certainement à plusieurs sucres migrant comme le glucose. Elle apparaît dès la trentième minute mais n'atteint son maximum qu'après deux heures d'hydrolyse.

II. Etude de la tache C

Afin de séparer les sucres du groupe C dont les taches sont confondues quand on emploie le solvant butanol, nous avons utilisé le solvant pyridine-acétate d'éthyle en écoulement continu. Les chromatogrammes obtenus au cours de l'hydrolyse ont alors révélé trois taches qui permettaient d'identifier les glucose, galactose et mannose, sucres décelés par FREEMAN dans les polyosides T et Typhi murium (figure 8 a et b).

FIGURE 7

Chromatogrammes obtenus au cours de l'hydrolyse des polyosides
par une solution de SO_4H_2 à 110°



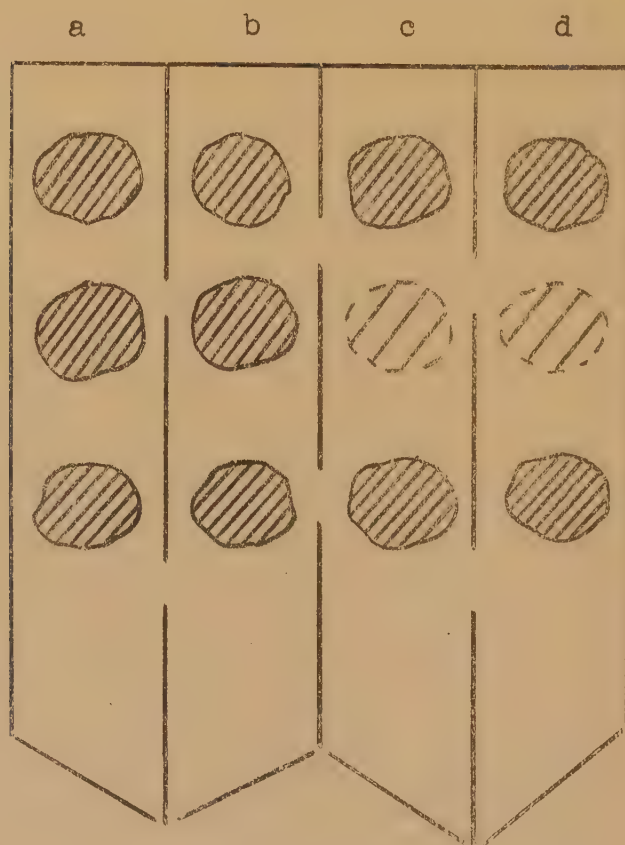
Des polyosides sont hydrolysés pendant des temps différents (exprimés en heures (h.) ou minutes (') en haut du tableau).

Les chromatogrammes obtenus avec ces hydrolysats varient avec le temps de l'hydrolyse. L'identification des taches A, B et C est indiquée pages 38 et suivantes.

(Solvant butanol-acide acétique. Révélation au phtalate d'aniline)

FIGURE 8

Séparation des sucres de la tache C



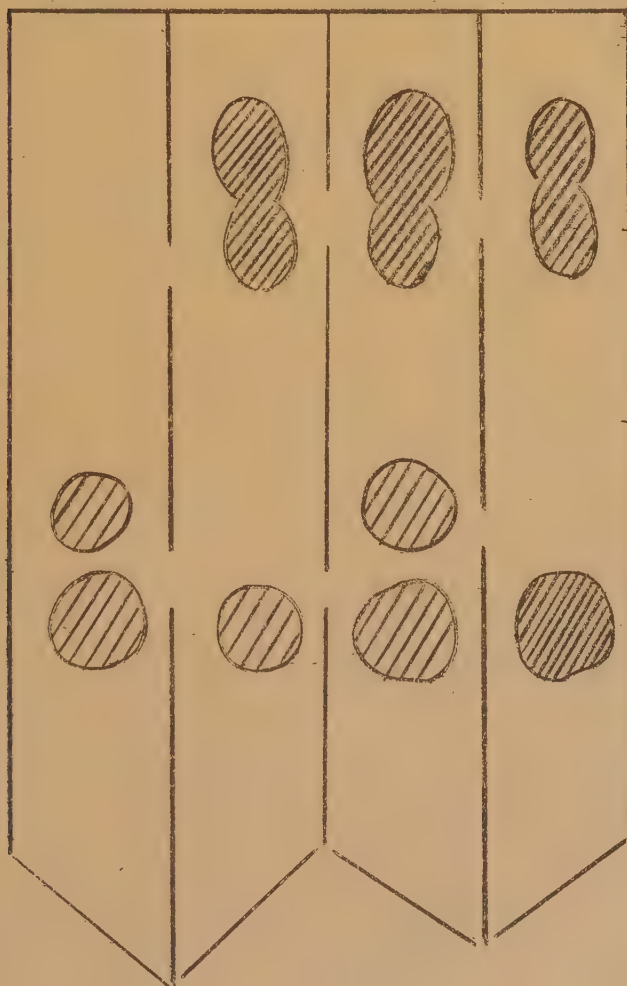
de gauche à droite :

- a étalons galactose, glucose, mannose
- b hydrolysats du polyoside T
- c hydrolysats du polyoside B
- d hydrolysats du polyoside T.M.

FIGURE 9

Identification du rhamnose

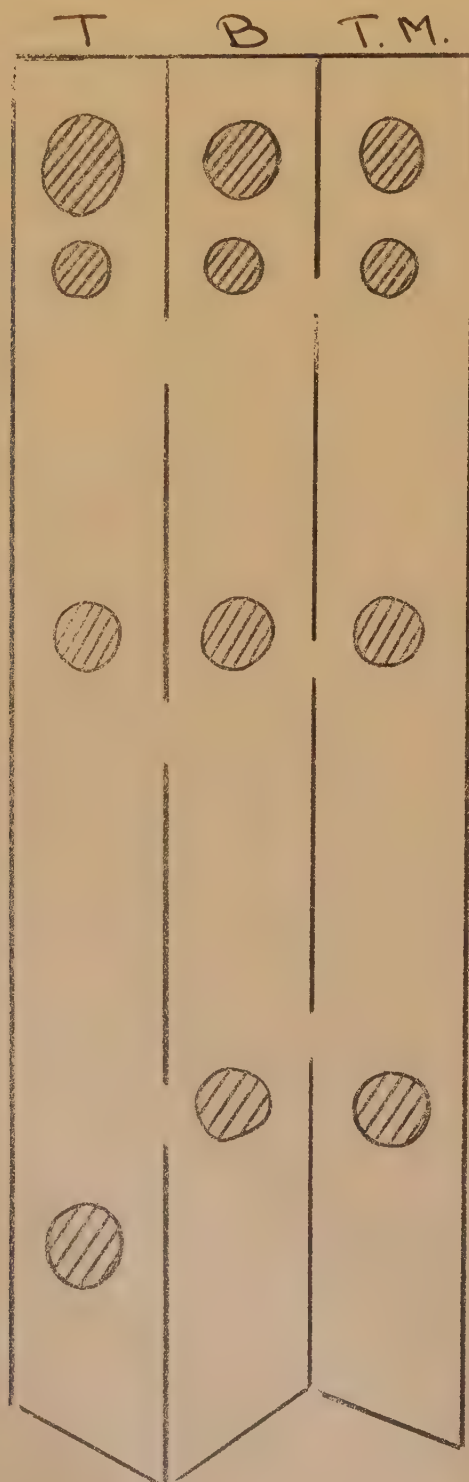
fucose	polyoside	polyoside	polyoside
rhamnose		fucose	rhamnose



Le rhamnose se superpose à la tache B du polyoside et augmente son intensité (chromatogramme de droite) tandis que le fucose constitue une tache supplémentaire sur le chromatogramme du polyoside + fucose.

FIGURE 10

Chromatogrammes des hydrolysats des différents polyosides.



Le R_F de la tache incon-
nue est différent sur
les chromatogrammes des
polyosides typhiques (T
et paratyphiques (B) ou
typhi murium (T.M.)).

(Solvant acétate d'éthy-
le-acide acétique ; le
galactose et le glucose
sont confondus)

Les polyosides des trois espèces étudiées contiennent les mêmes sucres mais en quantités différentes. En effet, si les chromatogrammes du polyoside typhique montrent trois taches apparaissant avec des intensités voisines, sur les chromatogrammes des polyosides para B et Typhi murium, au contraire la tache correspondant au glucose est très estompée et disparaît lorsqu'on chromatographie des quantités trop faibles d'hydrolysats.

La glucosamine a un R_F voisin de celui du groupe glucose mannose, galactose, et peut être mise en évidence par la réaction d'ELSON et MORGAN, adaptée à la chromatographie, comme nous l'avons indiqué plus haut (Cf. p. 19). Nous avons retrouvé dans les hydrolysats de nos polyosides les traces de glucosamine indiquées par le dosage.

III. Identification de la tache B

Le R_F de cette tache pouvait évoquer le rhamnose, le ribose, le xylose et le fucose. Après révélation au phtalate d'aniline sa teinte est marron-gris, un peu différente de celle des aldo-hexoses qui sont bruns, tandis que les pentoses sont rouges. On peut donc conclure à l'absence de pentoses, par conséquent de xylose et de ribose. La révélation au naphtorésorcinol fait apparaître cette tache en bleu-violet à la température de 75° comme les pentoses et les méthylpentoses. Parmi les méthylpentoses nous devons différencier le fucose et le rhamnose dont les R_F sont voisins ; pour cela nous avons fait migrer sur la même feuille de papier dans le solvant butanol : le mélange des deux sucres, l'hydrolysats du polyoside seul, l'hydrolysats + le fucose, l'hydrolysats + le rhamnose. L'examen de la figure 9 montre que la tache B se place au niveau de la tache du rhamnose et apparaît beaucoup plus foncée sur le chromatogramme de l'hydrolysats + rhamnose ; tandis que le chromatogramme de l'hydrolysats + fucose présente une tache supplémentaire au niveau du fucose et sa tache est d'intensité égale à celle obtenue avec l'hydrolysats seul. Le rhamnose migre donc exactement comme le sucre de la tache B dont on ne peut le différencier ni par le R_F , ni par des révélations spécifiques. La tache B est due par conséquent à la présence de rhamnose dans nos polyosides. Nous n'avons pas cru utile d'éluer la tache B et de caractériser le rhamnose ainsi séparé, puisque le sucre a déjà été identifié dans le polyoside typhique par YOKOYAMA (18), ensuite par WESTPHAL et LÜDERITZ (50).

IV. Essai d'identification de la tache A

La figure 7 nous indique que la tache A, la première à apparaître sur le chromatogramme, s'estompe après 6 heures d'hydrolyse, alors qu'après ce temps d'hydrolyse, l'intensité des au-

tres taches est maximum. Ce ne peut être une fraction mal hydrolysée du polyoside, car elle migrerait moins vite que les autres sucres ; pour nous en assurer, nous avons vérifié que ce composé ne pouvait pas être précipité par l'alcool des hydrolysats de deux heures, comme le serait ce polyoside lui-même. Nous avons pensé qu'il s'agissait d'un constituant du polyoside lié à un groupement hydrophile qui le faisait migrer plus vite, présentant des propriétés réductrices lui permettant d'apparaître sur le chromatogramme. Nous avons fait subir au polyoside une hydrolyse plus brutale en opérant à 150° avec la solution N de SO_4H_2 la tache ne se retrouve pas. De plus nous avons élué la tache A du chromatogramme d'un hydrolysats de deux heures, puis hydrolysé la solution obtenue selon la technique habituelle. En faisant à nouveau migrer nous avons pu constater que nous ne retrouvions pas la tache initiale et que les produits d'hydrolyse n'apparaissaient pas sur le chromatogramme.

La révélation au naphthorésorcinol et à l'urée montre qu'il ne s'agit pas d'un cétose (céto-rhamnose par exemple). Le bromophénol montre de même que ce constituant n'est pas un acide.

Le R_F de cette tache fait penser à un sucre méthylé. Nous nous proposons de séparer sur colonne de cellulose une assez grande quantité de ce constituant pour procéder à son identification.

Chacun des polyosides possède un constituant migrant vite mais les R_F diffèrent suivant qu'il s'agit du polyoside typhique ou des polyosides para B ou typhi murium (figure 10).

WESTPHAL et LÜDERITZ (50) ont effectué en même temps que nous une étude très semblable à la nôtre sur les polyosides extraits de *S. typhi* O 901 et *S. Abortus equi* ; cette dernière espèce appartient au même groupe que *S. para B*. Ils ont trouvé un composant migrant beaucoup plus vite que les autres sucres et comme pour nous, le R_F de ce constituant est identique pour les polyosides extraits des Salmonelles d'un même groupe, différent pour les polyosides extraits de Salmonelles de groupes différents. Toutefois la comparaison de leurs chromatogrammes et des nôtres montre que leurs constituants migrent avec des R_F légèrement différents des nôtres sans que nous puissions encore savoir si ces différences sont dues à la nature de ces constituants (le mode de préparation de leur polyoside est très différent du nôtre) ou à la différence entre la composition des solvants utilisés pour leurs chromatogrammes et les nôtres.

WESTPHAL et LÜDERITZ ont identifié leur "composant rapide" à du méthyl-désoxyglucose.

Dosage des sucres séparés par chromatographie

Nous opérons sur 10 mg. de polyoside dissous dans 1 cm³ de solution normale de SO₄H₂ et hydrolysés 6 heures à 110°.

Dosage du rhamnose

Nous faisons migrer des taches d'hydrolysats et de rhamnose, comme il est indiqué page 27 en chromatographie ascendante dans le solvant phénol. Il suffit dans ce cas de faire sécher les chromatogrammes à l'air.

Nous avons dosé 20 % de rhamnose dans le polyoside typhique et 13 % dans les polyosides B et T.M.

Dosage des glucose, mannose, galactose

Nous opérons comme il a été indiqué plus haut (p. 27). Nous avons dosé les sucres dans deux hydrolysats différents de chaque polyoside ; avec chacun de ces hydrolysats nous avons développé deux chromatogrammes à deux reprises. Les résultats obtenus au cours de tous ces essais sont constants. Ils sont indiqués dans le tableau X. Dans tous nos essais les résultats sont rapportés au poids du polyoside.

Tableau X

Pourcentage des différents sucres contenus dans le polyoside

Polyosides	Galactose	Glucose	Mannose	Rhamnose	Total
T	25	25	25	20	95
B	18	5	20	13	56
T.M.	18	5	20	13	56

Les résultats sont exprimés en milligrammes de sucres pour 100 milligrammes de polyoside.

Le polyoside typhique contient 25 % de glucose, mannose et galactose, un peu moins de rhamnose (20 %) soit un total de 95 %.

Par contre les sucres des polyosides B et T.M. n'atteignent qu'un taux de 56 %. La proportion de glucose chez chacun d'eux est très faible, comme nous l'avons déjà vu au cours de l'identification des sucres. Nous remarquerons l'identité parfaite des polyosides B et T.M.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Le bilan des résultats que nous venons d'exposer nous permet d'entrevoir la composition de chacun des polyosides et de comparer nos préparations à celles analysées par différents auteurs ; nous rechercherons ensuite les rapports que l'on peut trouver entre les propriétés immunologiques des différents polyosides et leur composition.

A) Polyoside typhique

Nos trois préparations de polyoside typhique obtenues à partir des germes de la souche O 901 et de deux cultures différentes des germes de la souche T 50-5 sont identiques au point de vue de leur composition chimique. Seul le taux d'azote et celui de la glucosamine varient légèrement indiquant une petite différence dans le degré de pureté des trois préparations. Le polyoside typhique, tel que nous l'avons préparé, se compose d'une partie non glucidique constituée de phosphates (1,2 % à 2,7 %), de radicaux acétylés (2,2 %) et de quelques impuretés azotées qui sont, selon les échantillons, constituées de glucosamine ou de restes protidiques (environ 2 % au total). Si nous faisons la somme de ces constituants non glucidiques, nous atteignons le total d'environ 7 % du polyoside pour la partie proprement glucidique.

La composition en sucres de la partie proprement glucidique fournie par l'analyse chromatographique donne : 25 % de glucose (rapporté au poids du polyoside brut), 25 % de galactose, 25 % de mannose, 20 % de rhamnose, soit au total 95 %. En réalité, l'hydrolyse du polyoside ajoute 10 % d'eau aux sucres qui entrent dans sa composition, on devrait donc trouver $95 + 9,3$, soit environ 102 % au lieu des 95 % effectivement fournis par l'analyse. Ce léger déficit peut tenir au manque de rigueur de la méthode utilisée, malgré tous nos soins pour l'améliorer. Mais il ne faut pas oublier non plus que dans cette analyse nous n'avons pas tenu compte du sucre inconnu de la tache A, qui a presque totalement disparu après 6 heures d'hydrolyse, sans fournir d'autres sucres réducteurs révélabiles sur le chromatogramme.

Ce déficit devra donc aussi se trouver dans le dosage global des sucres réducteurs, puisque le maximum dosé n'est ob-

tenu qu'après 6 heures d'hydrolyse. La méthode de SOMOGYI-NELSON donne 62-65 % pour ce maximum, soit une valeur moyenne de 63,5 %. Nous savons qu'il s'agit là d'une valeur très inférieure à la réalité ; en effet nous avons rapporté tous nos résultats à la courbe du glucose, et ce sucre est justement celui qui, par cette méthode de dosage, donne la plus forte réaction colorée (figure 1 chapitre II, page 14). C'est ainsi que le rhamnose par exemple, donne un coefficient d'extinction près de trois fois plus faible que celui fourni par la même quantité de glucose. Or le glucose n'entre que pour 25 % dans la composition de notre polyoside, le reste étant constitué par les galactose (25 %), mannose (25 %) et rhamnose (20 %). Il nous est possible, connaissant cette composition de calculer, d'après la figure 1 du chapitre II (p. 15), à quoi correspondent réellement les 63,5 trouvés au maximum de l'hydrolyse en se rapportant à la courbe du glucose.

20 microg. de rhamnose donnent la même couleur que 7 microg. de glucose

50	"	de galactose + mannose	30	"
25	"	de glucose	25	"

Donc 95 microgrammes de sucres dans la proportion où ils se trouvent dans le polyoside, titrent, en se rapportant à la courbe du glucose 67 microgrammes seulement de sucres. Il est facile de calculer inversement que les 63,5 % trouvés correspondent réellement à 90 % de sucres, valeur voisine des 95 % donnés par les dosages par chromatographie et inférieure aux 102 % théoriques. Ceci donnerait une teneur voisine de 10 % du polyoside pour le sucre inconnu (peut-être le méthyl-désoxyglucose de LUDERITZ et WESTPHAL) disparu au maximum de l'hydrolyse.

Bilan de l'analyse du polyoside typhique

90 % de sucres rédu- cteurs	A	(glucose	2 5 %	
		(mannose	2 5 %	
		(galactose	2 5 %	
		(rhamnose	20 %	
		(X (méthyl-désoxyglucose ?) ..	5 à 10 %	
6 % de com- posants non glucidiques	B	(phosphates (P:O, 0 à 0,9 %) 1,2-2,7		moyenne 2 %
		(acides aminés	0,3-2,5 %	} moyenne 2 %
		(glucosamine	1,5-0 %	
		(acétyl (fixé sur la glucosamine et peut-être sur le sucre mé- thylé)	3-2,2 %	moyenne 2 %

Le bilan ci-dessus permet d'établir la composition de notre polyoside typhique telle qu'elle ressort de cette étude. Il nous a semblé intéressant de comparer nos résultats à ceux

obtenus par les autres auteurs qui ont travaillé sur le même polyoside typhique.

A notre connaissance, trois études du polyoside typhique ont été faites (x) : celle de YOKOYAMA (18) au Japon, d'ELKIN (17) en Russie et de FREEMAN (15-16) en Angleterre. Le tableau XI indique les méthodes de préparations utilisées par ces dif-

TABLEAU XI

Préparation et analyse du polyoside typhique par les différents auteurs

Résultats	YOKOYAMA	ELKIN	FREEMAN	G. PON
Glucose	21	33	40	25
Galactose	21	21	17	25
Mannose	22	22,5	21	25
Rhamnose	23	-	-	20
Glucosamine	-	7,5	-	traces
Dosage par	osazones	osazones	osazones	chromato-graphie
Milieu de culture	bouillon gélosé	bouillon gélosé	milieu synthétique	bouillon gélosé
Préparation	Hydrolyse HCl des germes	Hydrolyse acétique de l'antigène somatique	Hydrolyse acétique des germes ou de l'antigène somatique	Hydrolyse acétique des germes

Les résultats sont exprimés en grammes de sucres pour 100 grammes de polyoside, sauf ceux d'ELKIN (3e colonne) qui sont rapportés à la somme des sucres réducteurs.

(x) Nous ne tenons pas compte ici de l'étude de LÜDERITZ et WESTPHAL dont nous n'avons eu connaissance que par la complaisance de ces auteurs, puisqu'elle était inédite au moment de la rédaction de ce mémoire. Elle ne comporte d'ailleurs encore aucune analyse quantitative des sucres constitutifs du polyoside typhique.

férents auteurs, les pourcentages de sucres qu'ils ^{ont} trouvés ainsi que les techniques qu'ils ont employées pour le dosage de ces sucres.

Nous avons vu au cours de l'exposé des résultats que nos préparations de polyoside sont identiques à celles de FREEMAN pour toute la partie non glucidique. Par contre, l'analyse des sucres diffère profondément. FREEMAN n'a identifié et dosé que le glucose, le mannose et le galactose et, en faisant le bilan de l'analyse de son polyoside, il a trouvé un déficit de 20 %. L'emploi de la chromatographie sur papier a permis de déceler la présence de rhamnose dans le polyoside typhique et de le doser ; nous avons ainsi retrouvé les 20 % de substance manquant au bilan de FREEMAN.

Mais dans la suite de notre travail, le dosage des autres sucres ne nous a pas donné les mêmes résultats qu'à FREEMAN. L'utilisation des méthodes de dosages différentes peu précises pourrait à la rigueur expliquer les différences trouvées pour les galactose et mannose. Cette explication ne saurait valoir pour la différence considérable entre la teneur en glucose de notre polyoside et celle trouvée par FREEMAN, l'écart étant du simple au double.

Il semblerait donc que nos deux polyosides ne soient pas identiques. On ne peut en rendre responsable le mode de préparation rigoureusement identique entre nos mains et celle de FREEMAN. Deux explications restent possibles :

La première serait la différence entre nos souches et celle de FREEMAN : les nôtres ne contenaient pas l'antigène Vi, contrairement à la souche Ty2 utilisée par FREEMAN. La seconde explication possible serait la différence des milieux de culture : bouillon gélosé pour nous, milieu synthétique liquide pour FREEMAN. La gélose ne peut être incriminée, car un tamisage très strict l'a complètement éliminée après la dessiccation des germes à l'acétone ; un extrait aqueux de ces germes ne précipite pas, en effet, un sérum antigélose. Par contre, on sait que la composition du milieu peut influencer sur le catabolisme microbien. Aucune étude, à notre connaissance, n'a porté sur les variations quantitatives des sucres constituant le polyoside en fonction du milieu de culture, et le rôle de celui-ci peut expliquer les différences entre les résultats de FREEMAN et les nôtres. Une nouvelle étude est nécessaire pour élucider ce point.

Les polyosides analysés par YOKOYAMA (18) et par ELKIN (17) (voir tableau XI) sont extraits, comme les nôtres, des germes cultivés sur bouillon gélosé ; mais les méthodes d'extraction des polyosides sont différentes, ce qui peut expliquer les différences observées.

ELKIN (17) prépare d'abord l'antigène somatique de BOIVIN en traitant les germes par l'acide trichloracétique, il en extrait ensuite le polyoside par hydrolyse acétique. Sa préparation n'est purifiée que par une seule précipitation alcoolique, alors que la méthode de FREEMAN comporte 6 précipitations fractionnées par l'alcool et 3 précipitations acétiques. Ceci explique peut-être la présence des 7,5 % de glucosamine identifiée dans les complexes moins dégradés (polyoside extrait par hydrolyse alcaline, complexe lipido-glucidique de LÜDERITZ), présente aussi sans doute dans l'antigène somatique de BOIVIN. Le rhamnose n'a pas été identifié. Il est difficile de rapprocher exactement des nôtres les pourcentages de sucres réducteurs trouvés par cet auteur, car ils ne sont pas rapportés au poids de polyoside brut, mais à la somme des sucres réducteurs dosés dans ce polyoside par la méthode de HAGEDORN-JENSEN. Toutefois, les valeurs trouvées pour le galactose et le mannose sont du même ordre de grandeur que les nôtres ; par contre ELKIN trouve une proportion plus grande de glucose.

Ce sont les résultats de YOKOYAMA (18) qui se rapprochent le plus des nôtres, bien que la méthode de préparation qu'il utilise soit différente. Le polyoside est extrait des germes secs par une succession d'hydrolyses acides et alcalines. Le rhamnose a été découvert par cet auteur et dosé ainsi que les trois sucres du polyoside, par formation d'osazones. YOKOYAMA élimine par fermentation sélective les sucres qui pourraient gêner le dosage. Comme on le voit sur le tableau, les pourcentages trouvés pour les différents sucres sont très voisins de nos résultats.

B) Polyoside B et T.M.

Après avoir établi la composition glucidique du polyoside typhique, nous avons cherché à connaître celle du polyoside para B dont la formule antigénique est différente. Les résultats obtenus montrent que ces 2 polyosides sont très dissemblables. Nous avons voulu ensuite comparer deux polyosides appartenant à des espèces ayant la même formule antigénique : la composition chimique du polyoside typhi murium se rapproche beaucoup de celle du polyoside B, mais en diffère par certains points, comme le montre l'étude des résultats de l'analyse.

Comme le polyoside T, le polyoside B contient quelques impuretés azotées et des traces de glucosamine. Par contre le taux d'azote du polyoside T.M. atteint 1,12 % et nous ne sommes pas arrivées à le diminuer de façon appréciable malgré tous les essais de purification tentés. Il semble que cet azote soit lié dans la molécule de polyoside T.M. d'une autre façon que dans

la molécule des polyosides T et B. De même le taux de glucosamine dosé dans le polyoside T.M. (2,6 %) est le plus fort que nous ayons obtenu.

La composition en sucres de la partie proprement glucidique fournie par l'analyse chromatographique est exactement identique pour les polyosides B et T.M. et très différente de celle du polyoside typhique. Le pourcentage de glucose est très faible (5 % au lieu de 25 % dans le polyoside T) et le total des quatre sucres dosés n'atteint que 56 % du poids du polyoside. Ce résultat laisse un énorme déficit dans le bilan de la composition des polyosides.

Bilan

		B	T.M.
A partie glucidique	(Glucose	5 %	5 %
	(Mannose	20 %	20 %
	(Galactose	18 %	18 %
	(Rhamnose	13 %	13 %
	(X	-	-
B partie non glucidique	(Phosphates	1,5 %	3 %
	(Acides aminés	3 %	5 %
	(Glucosamine	traces	2,6 %
	(Acétyl	6,6 %	5,5 %

Le sucre inconnu de la tache A n'est pas dosé, mais l'intensité de cette tache sur le chromatogramme révélé n'est pas plus forte que celle des autres sucres. Il faudrait supposer que ce sucre inconnu comporterait très peu de groupements lui permettant d'apparaître sur le chromatogramme par rapport à son poids. Nous savons que ce sucre est différent de celui de la tache A du polyoside typhique, puisque leurs R_F ne sont pas identiques.

Ce sucre a disparu du chromatogramme après 6 heures d'hydrolyse, au moment où le pouvoir réducteur atteint son maximum. Les 50% de sucres réducteurs dosés ne contiennent donc en principe que du glucose, mannose, galactose et rhamnose dont nous connaissons maintenant les proportions et nous pouvons corriger ce chiffre, comme nous l'avons fait pour les sucres du polyoside typhique :

13	microg.	de rhamnose donnent la même couleur que	4,6	de glucose
38	"	de galactose + mannose	23	"
5	"	de glucose	5	"

donc 56 microgrammes de sucres dans la proportion où ils se trouvent dans le polyoside B ou T.M. titrent seulement 32,6 microgrammes de sucres exprimés en glucose de telle sorte que les 50 % de sucres réducteurs dosés dans ces polyosides correspondent en réalité à 86 %. Ce calcul devrait nous amener, comme dans le cas du polyoside typhique, à un pourcentage de sucres voisin de celui obtenu par l'analyse chromatographique, pourtant le taux de sucres réducteurs (86 %) est bien supérieur à celui des sucres dosés par chromatographie (56 %). Il semblerait que le sucre inconnu déjà assez dégradé par 6 heures d'hydrolyse pour ne plus apparaître sur le chromatogramme soit encore dosé en partie par la méthode de SONOGYI-NELSON. L'identification de ce sucre permettra seule de confirmer cette hypothèse et de compléter le bilan de l'analyse des polyosides B et T.M.

Nous avons vu que la partie glucidique de ces deux polyosides était la même. Pourtant l'étude des courbes d'hydrolyse (p. 34) avait montré que les sucres du polyoside T.M. étaient beaucoup plus vite libérés que ceux du polyoside B. On peut penser que ces deux polyosides sont constitués des mêmes éléments qui seraient groupés de façon différente dans la molécule, ce qui expliquerait également la différence de comportement de ces deux polyosides au cours de la purification.

Les différences existant entre ces deux polyosides et le polyoside typhique sont beaucoup plus considérables. La proportion de glucose est bien plus forte dans le polyoside typhique (25 %) que dans les polyosides para B ou T.M. (5 %). Le bilan que nous avons proposé pour la composition du polyoside typhique est complet si l'on ajoute aux résultats des dosages 5 à 10 % du sucre inconnu ; par contre le bilan de l'analyse des polyosides B et T.M. présente un large déficit difficilement explicable par la seule présence du sucre inconnu différent de celui du polyoside typhique, non dosé.

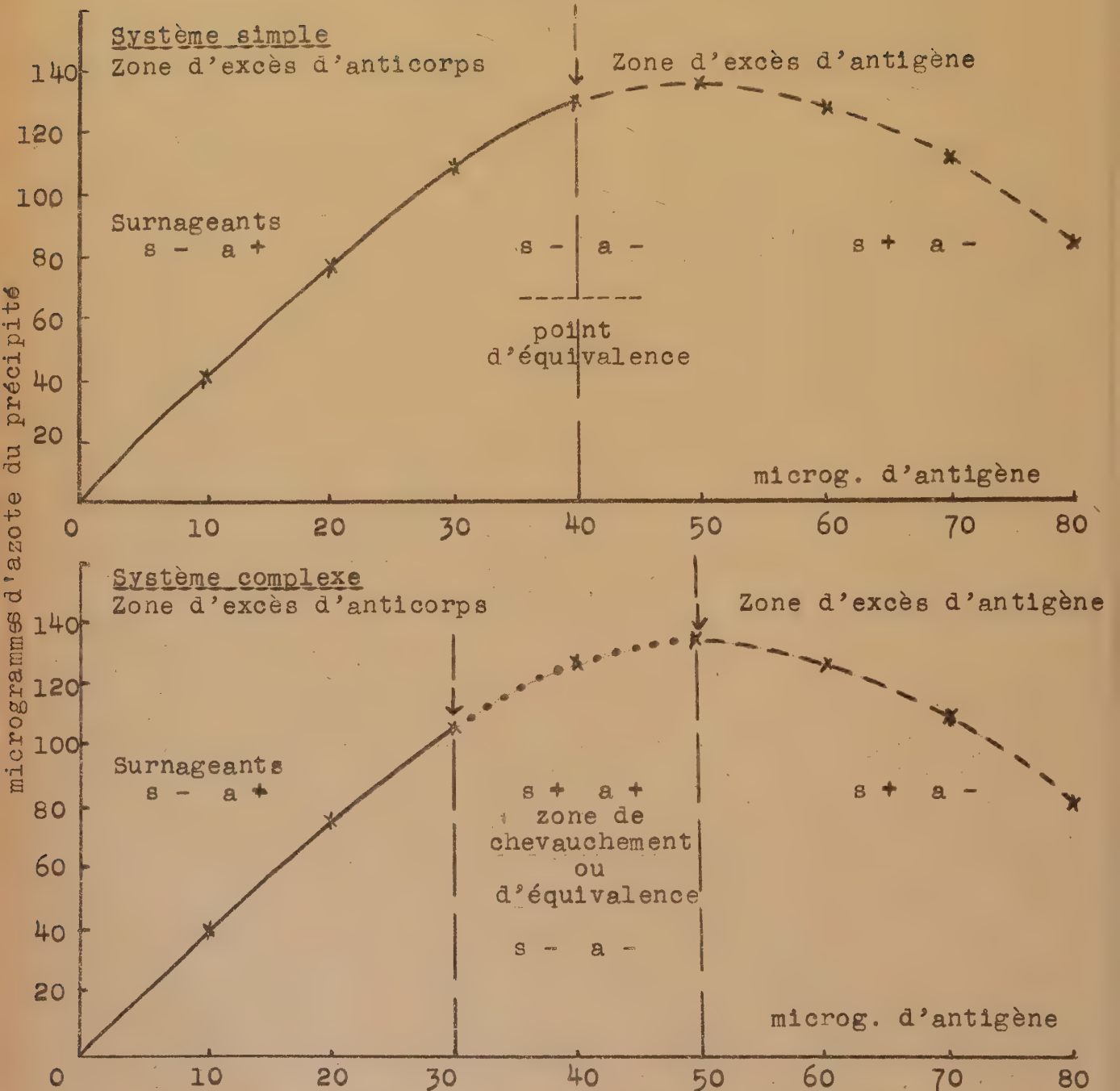
L'étude du polyoside T.M. a été faite également par FREEMAN (16) qui a dosé 31 % de glucose, 21,5 % de mannose et 19 % de galactose. Comme pour le polyoside typhique nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats que cet auteur. Nous ne pouvons pas incriminer la précision des méthodes de dosage, l'écart étant vraiment trop important (31 % de glucose dans le polyoside de FREEMAN, 5 % dans le nôtre). La composition antigénique des 2 souches de *S. Typhi murium* utilisées par FREEMAN et par nous-même étaient identiques ; il faut donc penser que la culture des germes en milieu synthétique a fourni un polyoside nettement différent de celui que nous avons obtenu avec une culture en bouillon gélosé.

L'analyse chimique nous a donc montré de nettes différences entre les polyosides extraits de *S. typhi* et *S. paratyphi* B. Alors que nous connaissons les constituants principaux du

polyoside typhique, nous avons un déficit important dans l'analyse des polyosides extraits de *S. paratyphi B* et *Typhi murium*, dans lesquels le sucre que nous n'avons pu encore identifier semble être en plus forte proportion. Les polyosides de ces deux dernières espèces présentent de très faibles différences. Nous allons chercher à comparer ces divers polyosides par l'étude de leurs propriétés immunochimiques qui pourra peut-être nous aider à expliquer les ressemblances et les différences de leur constitution chimique.

ETUDE IMMUNOCHIMIQUE

FIGURE 11
Courbe théorique



La quantité d'anticorps précipité croît avec la quantité d'antigène ajoutée, elle atteint un maximum quand tous les anticorps du sérum sont précipités, puis décroît dans la zone d'excès d'antigène par suite de la formation de complexes antigène-anticorps solubles en présence de cet excès d'antigène.

INTRODUCTION

Les polyosides que nous avons préparés ne sont pas antigéniques pour le lapin, comme toutes les préparations purifiées des polyosides des Salmonelles. Ils précipitent par contre, les sérums préparés en injectant aux animaux soit des germes identiques à ceux d'où on les a extraits ou leur antigène somatique, soit des germes de constitution antigénique voisine. Il nous a semblé utile de les étudier au moyen des méthodes immunochimiques dont l'emploi se généralise aujourd'hui.

Grâce aux techniques de précipitation en milieu gélifié de OUDIN et d'OUCHTERLONY (Cf. page 62 les techniques), on peut facilement dénombrer les antigènes présents dans une solution et donc apprécier l'homogénéité des préparations antigéniques. Nous avons également utilisé les courbes de précipitation de HEIDELBERGER et KENDALL (51), obtenues en portant en abscisse les quantités d'antigène ajoutées à une quantité fixe de sérum et en ordonnée l'azote des anticorps précipités (figure 11). Cet azote se confond avec celui du précipité puisque nos antigènes en sont pratiquement dépourvus.

La figure 11 représente une courbe théorique de précipitation spécifique. Au début de la courbe, la quantité d'azote du précipité, et par conséquent la quantité d'anticorps précipités croît avec la quantité d'antigène ajouté.

Le maximum d'azote dosé est atteint lorsque tous les anticorps du sérum sont précipités. En continuant à ajouter de l'antigène on obtient des quantités d'anticorps précipités plus faibles par suite de la formation de complexes antigène-anticorps solubles en présence de cet excès d'antigène.

Pour savoir dans quelles conditions s'est faite la précipitation dans chacun des tubes contenant des quantités différentes d'antigène, on recueille le liquide surmontant les précipités après centrifugation (le "surnageant") et on recherche s'il contient encore des anticorps ou de l'antigène (voir étude des "surnageants" page 62).

Au début de la courbe la précipitation se fait en présence d'un excès d'anticorps. Lorsque tout l'antigène s'est combiné à tous les anticorps, la courbe atteint le point d'équivalence. Si ce phénomène se produit avec plusieurs quantités d'antigène ajoutées à la même quantité d'anticorps, on observe une zone d'équivalence large. Ceci a lieu lorsque plusieurs antigènes entrent

en jeu. On peut observer aussi dans ce cas un chevauchement des zones d'excès d'antigène et d'excès d'anticorps. En effet, à un système comportant deux antigènes a et b, correspondront des sérums comportant deux groupes d'anticorps A et B. On conçoit que la proportion de ces deux groupes d'anticorps ou de ces deux antigènes soit telle que certains anticorps soient saturés (excès d'antigène) alors que d'autres ne le sont pas encore (excès d'anticorps), ce qui explique le chevauchement des deux zones (voir la technique page 61 et sur la figure 11, le dessin de la courbe de précipitation théorique).

Après le point ou la zone d'équivalence la précipitation se fait en présence d'un excès d'antigène.

Ces techniques ont été très fructueuses dans l'étude des polyosides pneumococciques (52 et 53), des toxines (54), des ovalbumines (55 et 56). HORNUS et GRABAR (57) furent les premiers à entreprendre un travail immuno-chimique sur les polyosides des Salmonelles. Ces auteurs comparèrent les courbes de précipitation obtenues avec divers immun-sérums antityphiques de lapin et d'une part l'antigène somatique de BOIVIN, d'autre part les polyosides extraits des germes ou de l'antigène par hydrolyse acétique. Dans un mémoire plus récent STAUB et COMBES (58) confirmèrent les conclusions de ce premier travail, à savoir : les polyosides extraits de l'antigène ou des germes contiennent un haptène, toujours immunologiquement identique à lui-même, uni à plus ou moins d'impuretés sans activité immunologique. STAUB et COMBES montrèrent en outre que la purification du polyoside par la technique de FREEMAN, que nous avons nous-même utilisée au cours de cette étude, fournissait des préparations absolument identiques du point de vue immunologique dont le même poids précipitait toujours la même quantité d'anticorps d'un même immun-sérum.

Dans ce travail, il nous a semblé que l'étude quantitative des précipitations des divers sérums antityphiques et antiparatyphiques par nos trois polyosides (typhique T, paratyphique B, et typhi murium T.M.) pourrait fournir des indications sur les points suivants :

1) L'homogénéité de nos préparations, qui avait déjà fait l'objet d'une étude en milieu gélifié. On constate en effet (59) que les solutions homogènes fournissent des zones d'équivalence très étroites, alors que les préparations contenant plusieurs antigènes donnent une zone d'équivalence large, ou deux zones d'excès d'anticorps se chevauchant largement, comme nous l'avons signalé plus tôt.

2) L'identité ou la différence de constitution des polyosides extraits de diverses souches d'une même espèce (T O 901, T 50-5) suivant que les points expérimentaux obtenus avec chacun

des polysides se placeront ou non sur la même courbe (KABAT 59).

3) Les similitudes et différences existant entre nos divers polysides.

4) Les divers antigènes dénombrés dans la classification de WHITE-KAUFFMANN sont-ils portés par des molécules distinctes, ou sont-ils portés par une même molécule ? Autrement dit, pourrions-nous séparer, par exemple, dans nos préparations du polyside de *S. typhi* caractérisé par les antigènes (I IX XII), d'une part les antigènes réagissant seulement avec le sérum antipara B (I IV V XII) c'est-à-dire les antigènes I et XII, d'autre part les antigènes absents de *S. para B* soit l'antigène IX ?

Avant de passer en revue nos résultats expérimentaux et voir quels renseignements ils nous ont apportés, nous allons donner en détails le mode de préparation des divers immunosérums que nous avons utilisés, ainsi que les techniques de HEIDELBERGER et KENDALL (51) de OUDIN (60) et d'OUCHTERLONY (61).

MATERIEL et TECHNIQUES

Nous avons utilisé 5 immunosérums :

- n° 1 un sérum antityphique de lapin ;
- n° 2 un sérum antiparatyphique B de lapin ;
- n° 3 un sérum de lapin anti-antigène somatique typhique ;
- n° 4 un immunosérum antityphique de cheval ;
- n° 5 un sérum antiparatyphique B de cheval.

Tous ces sérums ont été recueillis stérilement, filtrés sur bougie et conservés à + 4° en ampoules scellées. Au moment de les utiliser, on ajoutait du merthiolate, à raison de 1/5.000 aussitôt après l'ouverture de l'ampoule, ce qui permettait de travailler sans précaution de stérilité.

Une étude systématique des animaux avant leur immunisation nous a permis de ne conserver que ceux dont le sérum ne contenait aucune agglutinine typhique ou paratyphique. On sait en effet que beaucoup de lapins et de chevaux "normaux" possèdent un faible taux de ces agglutinines. Au cours de l'immunisation le taux des agglutinines O monta régulièrement, tandis que les agglutinines H n'apparaissaient qu'en faible quantité (sauf pour le cheval n° 4 qui les possédait avant l'immunisation. Cf. ci-dessous). Par définition nos sérums coagglutinent les germes typhiques, para B (et parfois para A) qui possèdent les antigènes communs, mais pas les germes para C dont la for-

mule antigénique est tout à fait différente (Cf. tableau 1 de l'introduction, page 2).

Les taux d'agglutinines de ces sérums sont indiqués au tableau XI bis.

TABLEAU XI bis

Taux d'agglutination des différents sérums

Sérum	T.O	T.H	A.O	A.H	B.O	B.H	C.O	C.H
Cheval anti O 901 n° 4	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{25600}$	°	°	$\frac{1}{800}$	°	°	°
Cheval anti B 50-19 n° 5	$\frac{1}{400}$	°	$\frac{1}{100}$	°	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{400}$	°	°
Lapin anti O 901 n° 1	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{100}$	°	°	$\frac{1}{100}$	°	°	°
Lapin anti B 50-18 n° 2	$\frac{1}{200}$	°	°	°	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{100}$	°	°
Lapin anti antigène soma- tique O 901 n° 3	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{100}$	°	°	$\frac{1}{200}$	°	°	°

Préparation du sérum antityphique de cheval n° 4

a) Antigène. L'antigène est constitué par une culture de germes provenant de la souche O 901 entraînés selon la méthode habituelle (Cf. chapitre I préparation des germes secs) et cultivés 24 heures à + 37° C. en bouillon. Après deux lavages à la solution physiologique (NaCl 8,5 p. 1.000) les germes sont tués par chauffage d'une heure à 100° afin de détruire l'antigène H. La suspension est diluée dans la solution physiologique aux concentrations convenables.

b) Mode d'injection. Ce cheval avait servi primitivement à préparer un sérum anti H, il avait donc reçu une série d'injections de suspensions de la souche H 901 et le titre de son sérum en agglutinines H était de 1/25.000. On y trouvait des aggluti-

nines O au titre de $1/3200$. Il reçut alors 8 injections intraveineuses de la suspension de germes O 901 suivant le protocole suivant :

28 février	4 milliards de germes contenus dans					
					20 cm ³	
6 mars	8	-	-	-	-	-
9 mars	20	-	-	-	-	-
15 mars	40	-	-	-	-	-
17 mars	80	-	-	-	-	-
22 mars	140	-	-	-	-	-
24 mars	280	-	-	-	-	-
27 mars	420	-	-	-	-	-

Au cours de l'immunisation le taux des agglutinines O atteignit $1/6400$ après la troisième injection et s'y maintint jusqu'à la saignée finale qui eut lieu le 4 avril. C'est cette saignée qui nous a fourni le sérum utilisé dans tous nos essais.

Préparation du sérum de cheval antiparatyphique B n° 5

a) Antigène. Germes paratyphiques B de la souche B 50 19 traités exactement comme les germes de la souche O 901 injectés au cheval précédent.

b) Mode d'injection. 8 injections intraveineuses aux mêmes doses et intervalles de temps que pour le cheval précédent. Le titre en agglutinines O para B était de $1/6400$ lors de la saignée.

Préparation des sérums de lapin antityphique n° 1 et paratyphique n° 2

a) Antigène. Suspensions de germes identiques à celles utilisées pour les chevaux.

b) Mode d'injection. Il fut identique pour les deux sérums. Six lapins reçurent par la voie intraveineuse 2 injections par semaine. La première injection était de 1 milliard, la seconde de 2 milliards, les autres de 4 milliards de germes contenus dans 1 cm³. Nous avons fait 5 injections pour obtenir le sérum antityphique et 6 injections pour obtenir le sérum anti paratyphique B. Les animaux furent saignés 8 jours après la dernière injection, les 6 sérums furent mélangés avant filtration. Le taux en agglutinines était de $1/6400$ lors de la saignée.

Préparation du sérum anti-antigène somatique typhique n° 3

a) Antigène. L'antigène somatique fut préparé suivant la technique exacte de BOIVIN. Une culture de 18 heures sur gélose nutritive de S. Typhi O 901 est recueillie dans la quantité nécessaire de solution physiologique (environ 10 cm³ par boîte de Roux), lavée deux fois par cette solution puis mise en suspension dans de l'eau distillée glacée à raison de 0,1 g. de germes humides par cm³ d'eau distillée. On ajoute un égal volume d'une solution demi-normale d'acide trichloracétique et on laisse en contact pendant trois heures à + 4°. On dialyse contre l'eau courante jusqu'à ce que le pH soit alcalin (18 heures) puis contre l'eau distillée à froid jusqu'à disparition des chlorures (3 jours). On amène le pH à 6 avec une solution normale d'acide chlorhydrique. L'antigène somatique est alors précipité à froid (+ 4°) par 2 volumes d'alcool. Le précipité est redissous dans de l'eau distillée et dialysé pendant 3 jours. La concentration de la solution en antigène somatique est déterminée par pesée, après dessiccation à 110°, d'un volume exactement mesuré de la solution.

b) Mode d'injection. Pour obtenir des sérums suffisamment riches en précipitines, il faut injecter l'antigène absorbé sur de l'alumine. Au moment de l'injection nous ajoutons à nos solutions d'antigènes 1 cm³ d'une solution à 1 % d'alun ammoniacal puis la quantité de soude nécessaire pour précipiter l'alumine. Les lapins reçoivent alternativement, tous les 3 ou 4 jours, dans la veine et sous la peau, des injections contenant 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,4 mg. d'antigène, le taux de 0,4 mg. n'étant pas dépassé. Nous avons fait en tout 20 injections.

Technique de HEIDELBERGER et KENDALL (51)

a) Dosage de l'azote dans les précipités. Dans des tubes à centrifugation, on mesure la quantité choisie de sérum (0,5, 1 ou 2 cm³), et des quantités croissantes de polyoside dissous en solution physiologique ; on agite et on complète à volume constant (2 ou 2,5 cm³) avec de la solution physiologique. On agite encore et on laisse à + 4° pendant 48 heures. Nous préparons deux tubes avec chaque quantité d'antigène. Les solutions d'antigène sont faites dans la solution physiologique mertholatée qui nous sert également à diluer. Sérum et antigène doivent être centrifugés à froid avant d'être employés.

Après 48 heures, les tubes sont centrifugés à froid pendant 10 minutes à 6.000 tours/minutes, le liquide surnageant est gardé pour permettre la recherche d'un excès d'antigène ou d'anticorps (Cf. plus bas, étude des "surnageants"). Le précipité est remis en suspension dans deux gouttes de solution physiologique, puis on ajoute deux fois 1 cm³ de solution physiologique en agitant. Après 10 minutes les tubes sont centrifugés et on procède de la même manière à un autre lavage. Toutes ces opérations doivent se faire

la glacière pour éviter tout échauffement. Les précipités ainsi lavés sont ensuite transvasés avec précaution dans les matras et l'on dose l'azote qu'ils contiennent, par la microméthode de KJEHLDAL (Cf. techniques de chimie, page 11).

b) Etude des "surnageants". Les "surnageants" de chacun des précipités sont mis en contact d'une part avec du sérum, d'autre part avec une solution de polyside. On opère dans des tubes étroits en ayant soin de superposer les deux liquides sans les mélanger. A la surface de séparation, il se forme un disque de précipité (ring-test). Si la précipitation s'est faite en présence d'un excès d'anticorps (début de la courbe) l'anneau se produira dans le tube contenant le "surnageant" et l'antigène (S -, A +) (Tableaux XII et suivants). Dans la zone d'excès d'antigène, on verra l'anneau dans le tube contenant le "surnageant" et le sérum (S +, A -). La zone d'équivalence correspond aux tubes dont les surnageants ne précipitent ni avec l'antigène, ni avec l'anticorps (S -, A -). En cas de chevauchement des deux zones (Cf. figure 11) le "surnageant" précipite avec l'antigène comme avec l'anticorps (S +, A +).

Technique de OUDIN (60)

En superposant dans un tube du sérum gélifié et un antigène, l'antigène diffuse dans le sérum gélifié et précipite, lorsque les proportions sont convenables. On voit dans la hauteur du gel de sérum des zones de précipitation dont chaque maximum correspond à un antigène distinct.

Technique : Deux volumes de sérum (dilué ou non dans du sérum normal) sont ajoutés à 1 volume de gélose liquéfiée et maintenue à 46°. On remplit avec ce mélange des tubes de 2 mm. de diamètre sur une hauteur de 45 mm. ; puis on ajoute l'antigène en ayant soin de se placer dans une pièce à 18°. On regarde chaque jour comment progressent les zones de précipitation.

Technique de OUCHTERLONY (61)

La technique de OUCHTERLONY est assez comparable à celle de OUDIN, mais dans ce cas les deux réactifs (sérum et antigène) sont liquides et diffusent dans la gélose. Dans la pratique on met dans le fond d'une boîte de Petri une couche de gélose à 3 % dans laquelle sont ménagées des petites cuves à angle droit au moyen d'un moule spécial. On met l'antigène dans l'une de ces cuves et le sérum dans l'autre. Il apparaît autant de stries entre deux petites cuves qu'il y a de composants dans l'antigène. Il faut, comme pour la technique de OUDIN, éviter les variations de température qui font apparaître des précipitations non spécifiques.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nos résultats sont consignés dans les tableaux et les figures suivants. (Tableaux n° XII à XVI ; Figures n° 12 à 17).

Nous avons utilisé soit 0,5 cm³ (sérum de cheval réactions homologues) soit 1 cm³ (sérum de cheval réactions croisées et sérum de lapin réactions homologues) soit 2 cm³ de sérum (sérum de lapin réactions croisées) ; mais sur tous les tableaux pour pouvoir comparer plus aisément les courbes entre elles, nous avons ramené la quantité d'azote dosé à 1 cm³ de sérum pour tous les sérum. Le chiffre indiqué entre parenthèses représente le nombre de mesures faites pour la même quantité d'antigène. Nous avons indiqué la moyenne de ces mesures dont l'écart maximum atteint rarement ± 5 microgrammes. Pour l'étude des liquides surnageants, le "surnageant" est mis en présence de sérum (S) et d'antigène (A). Nous indiquons les réactions positives (anneau de précipité) par + et l'absence de réaction par -. Les zones d'équivalence ou de chevauchement sont encadrées.

TABLEAU XII

Courbes de précipitations du sérum antityphique de cheval n° 4
par les différents polyosides

Microg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside E. typhi O 901		Polyoside E. T 50-5	
	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant"	Microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant"
		S A		S A
10	100 (2)	- +	70 (2)	- +
20	206 (2)	- +	202 (1)	- +
30	304 (2)	- +	280 (2)	- +
40	406 (2)	- +	366 (2)	- +
50	444 (2)	- +	424 (2)	- +
60	480 (4)	- +	472 (2)	- +
70	506 (4)	- -	514 (2)	- +
80	512 (2)	+ -	500 (2)	+ -
Microg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside para B		Polyoside typhi murium	
	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ du sérum	"surnageant"	Microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant"
		S A		S A
5	/	/ /	60 (2)	- +
10	78 (2)	- +	92 (1)	- +
15	/	/ /	96 (2)	+ +
20	120 (4)	- +	100 (3)	+ +
40	152 (3)	+ +	102 (2)	+ +
50	/		102 (2)	+ +
60	160 (4)	+ +	136 (1)	+ +
80	180 (4)	+ +	132 (2)	+ +
100	178 (4)	+ -	/	
120	178 (4)	+ -	136	+ +
140	200 (4)	+ -	/	/
160	198 (2)	+ -	/	/
180	206 (2)	+ -	/	/
200	206 (2)	+ -	/	/
220	212 (2)	+ -	/	/

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

FIGURE XII

Courbe de précipitation du sérum antityphique de cheval n° 4
(0,5 cm³)

microg. d'azote
du précipité

avec les polyosides

typhiques O 901 •
T 50-5 x
paratyphique B
typhi murium

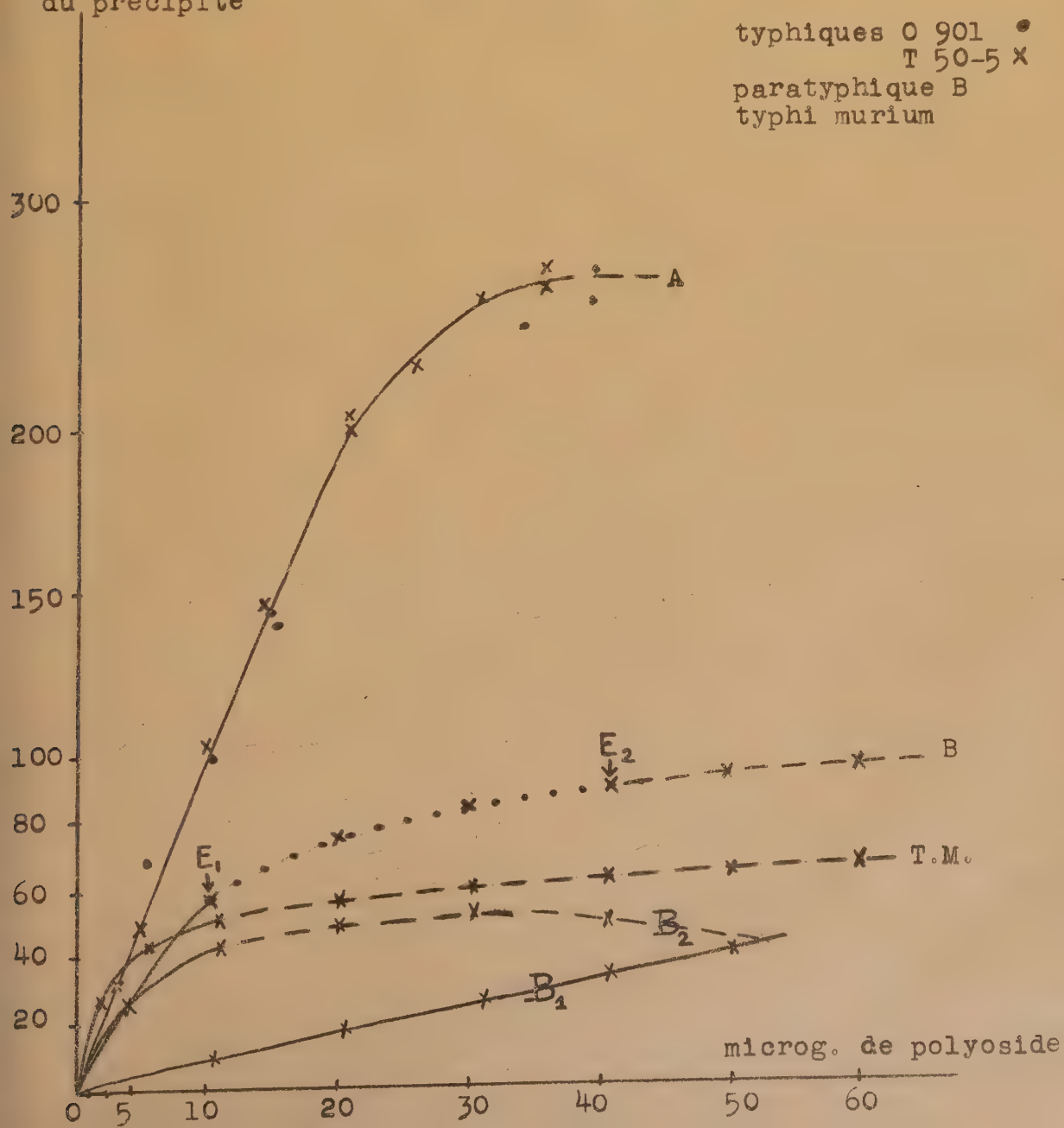


TABLEAU XIII

Courbes de précipitation du sérum anti-para B de cheval n° 5
par les différents polyosides

Microg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside d'E. typhi O 901		Polyoside de S. para B	
	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant" S A	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant" S A
5	34 (2)	- +	63 (2)	/ /
10	38 (2)	- -	117 (8)	- +
15	40 (2)	+ -	163 (2)	/ /
20	36 (2)	+ -	210 (7)	- +
25	36 (2)	+ -	/	/ /
30	/	/ /	220 (8)	- +
40	/	/ /	250 (8)	- +
60	/	/ /	360 (8)	- -
80	/	/ /	356 (7)	+ -

Microg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside de S. Typhi murium	
	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	"surnageant" S A
5	/	/ /
10	184 (2)	- +
15	/	/ /
20	284 (2)	- +
25	/	/ /
30	/	/ /
40	338 (2)	+ -
60	338 (2)	+ -
80	324 (2)	+ -

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

FIGURE 13

Courbe de précipitation du sérum anti-paratyphique B de cheval n° 5
(0,5 cm³)
avec les polyosides

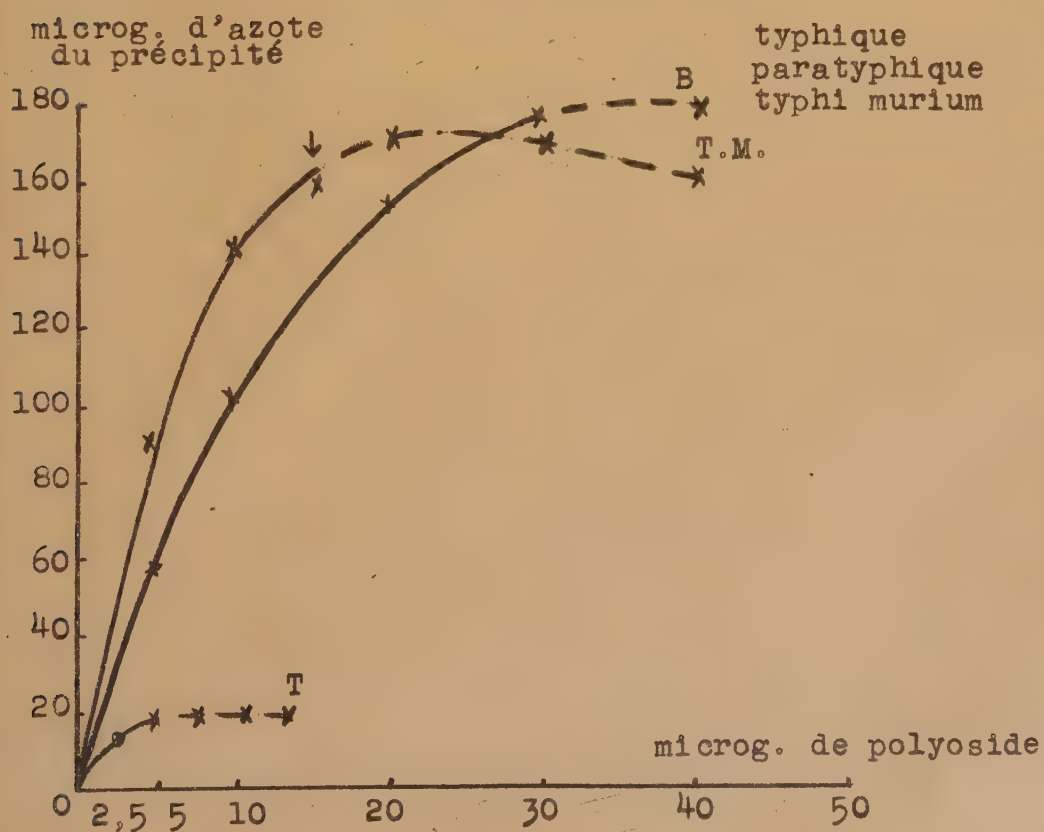


TABLEAU XIV

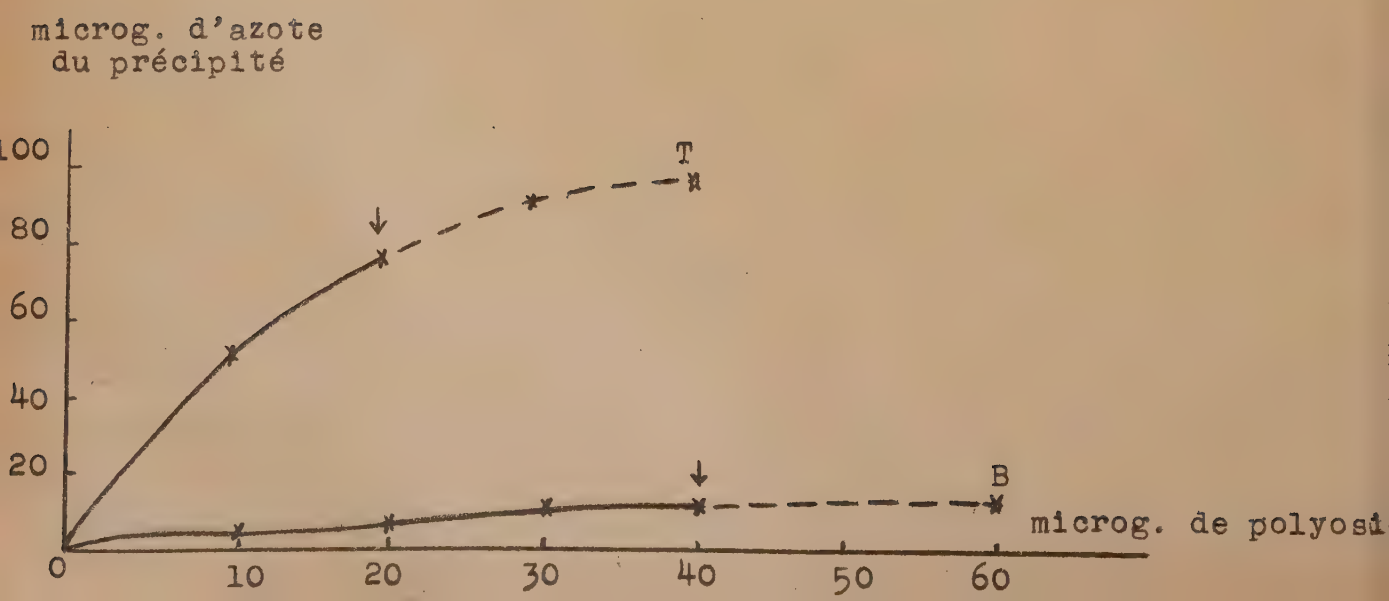
Courbes de précipitation du sérum de lapin anti-typhique n° 1
par les différents polyosides

microg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside d'E. Typhi O 901		Polyoside de S. para B	
	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	surageant S A	microg. d'azote précipités de 1 cm ³ de sérum	surageant S A
10	53 (2)	- -	0 (1)	- +
20	76 (2)	- -	5 (2)	- +
30	92 (2)	+ -	11 (2)	- +
40	97 (2)	+ -	12 (2)	- -
60			16	+ -

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

FIGURE 14

Courbes de précipitation du sérum anti-typhique O 901 de lapin n° 1
avec les polyosides typhique et paratyphique B



µg de polyoside ajoutés à 1 cm3 de sérum	Polyoside O 901		Polyoside para B		Polyoside T.M.	
	microg. d'azo précipités	S	microg. d'azo précipités	S	microg. d'azo précipités	S
5	20 (2)	-	63 (2)	-	195 (1)	-
10	28 (2)	-				
15	29 (2)	-				
20	26 (2)	+	81 (2)	-	140 (2)	+
30	25 (2)	+	115 (1)	+	160 (2)	+
40	20 (2)	+	134 (2)	+	163 (1)	-
60			144 (2)	+	142 (2)	-
80			146 (2)	+	130 (2)	-

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

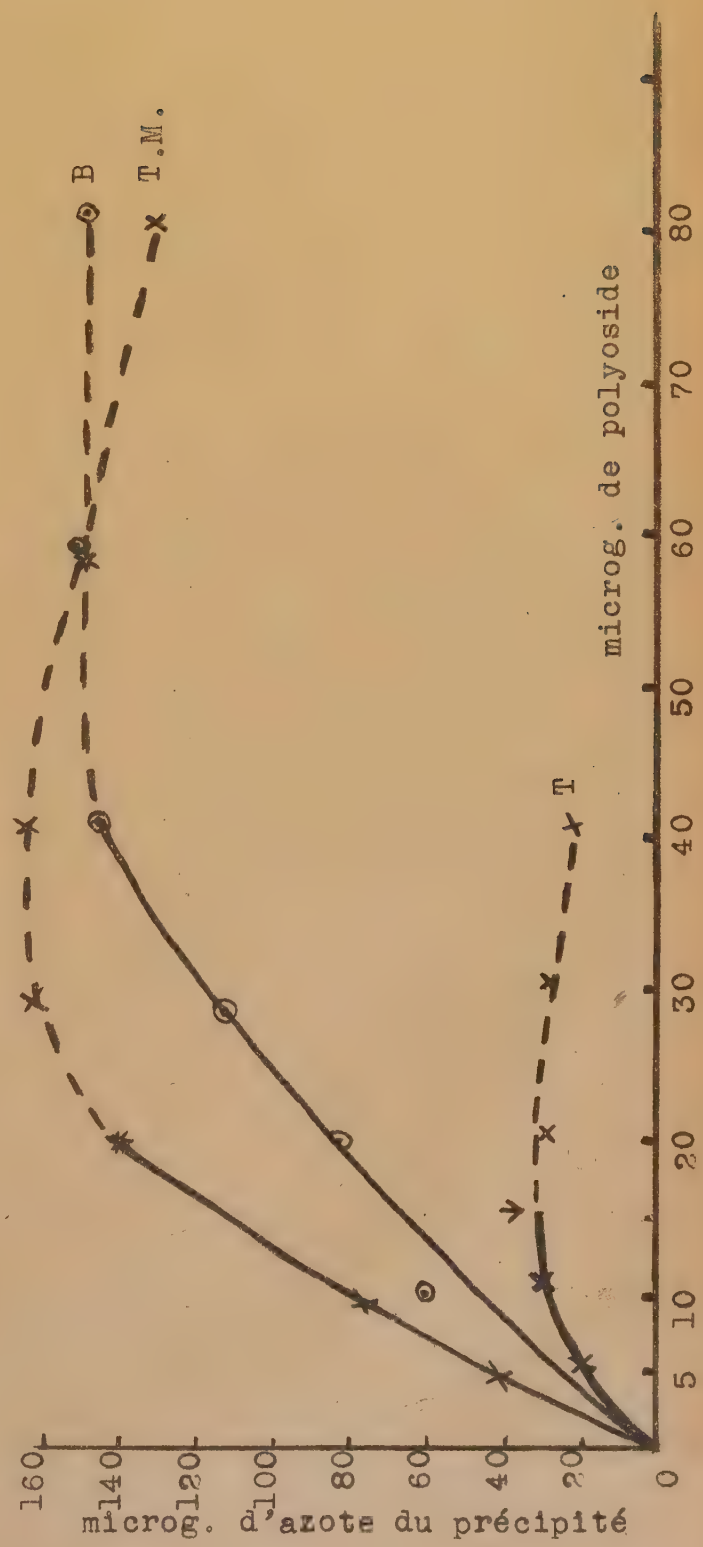


TABLEAU XVI
Précipitation de 1 cm³ du sérum de lapin anti-antigène somatique typhique n° 3

µg. de polyoside ajoutés à 1 cm ³ de sérum	Polyoside 0 901 µg. d'azote précipités	S -	A +	Polyoside de para B µg. d'azote précipités	S -	A +
10	51	-	+	5	-	+
20	99	-	+	11	-	+
30	144	+	-	21	+	+
40	161	+	-	28	+	+
50	160	+	-	38	+	-
60	/	/	/	47	+	-
80	/	/	/	42	+	-
100	/	/	/			
120	/	/	/			

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

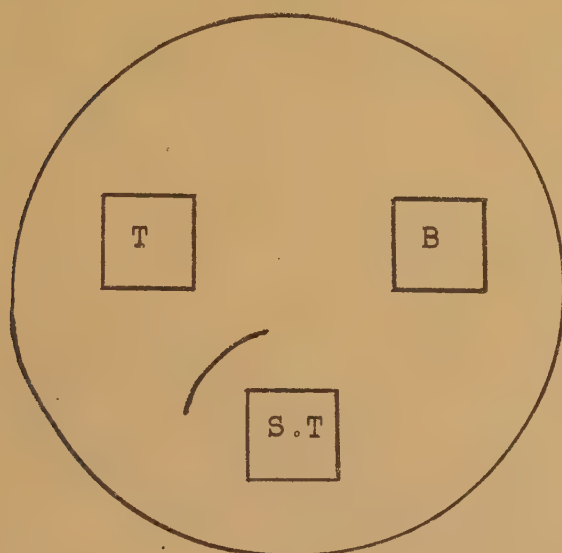


FIGURE 17. Précipitation en milieu gélifié.

Technique de OUCHTERLONY

A

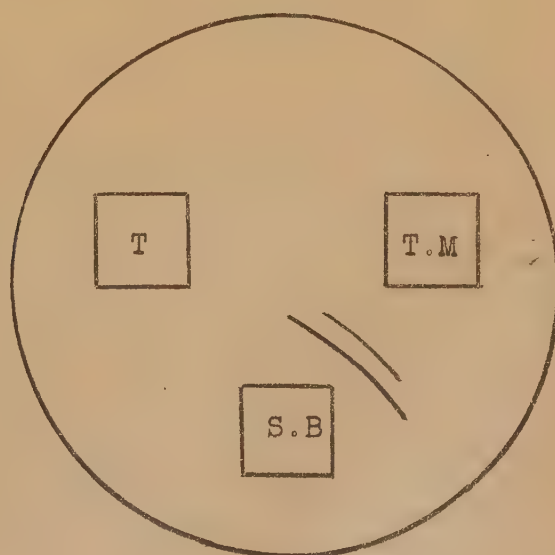
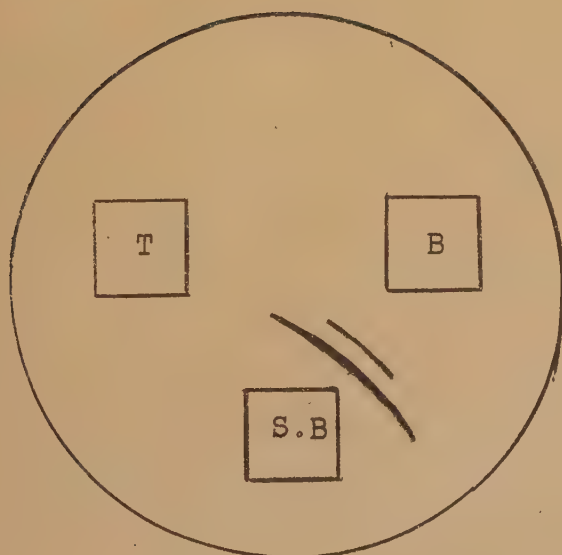
Sérum antityphique de cheval n° 4



Cuve T = Polyoside typhique
 Cuve B = Polyoside para B
 Cuve S.T. = Sérum antityphique
 de cheval n° 4

B

Sérum antiparatyphique de cheval n° 5



Cuve T = Polyoside typhique ; Cuve B = polyoside para B ;
 Cuve T.M. = Polyoside Typhi murium ; Cuve S.B. = Sérum anti-para B
 de cheval n° 5

Comme avec les tubes de OUDIN les réactions croisées ne donnent pas de lignes de précipité visibles.

DISCUSSION (°)

Les résultats expérimentaux consignés dans les tableaux XII à XVI et les figures n° 12 à 17 vont nous permettre de répondre aux questions posées dans l'introduction de l'étude immuno-chimique (pp. 56 et 57).

1°- Homogénéité des polyosides.

Les images données par les tubes de OUDIN ainsi que par les boîtes d'OUCHTERLONY (figure 17) sont peu nettes car nos préparations sont des polyosides ; on sait, en effet, que ces produits, contrairement aux protéines, donnent des images manquant de netteté avec ces techniques (60). Telles qu'elles sont, ces images révèlent la présence de deux fractions réagissant avec le sérum dans les solutions de polyoside para B et de polyoside T.M. (figure 17). Ceci est en accord d'ailleurs avec l'étude des "surnageants" recueillis au cours de la précipitation spécifique du sérum antityphique de cheval par ces polyosides, consignée dans le tableau XII : entre 40 microg. et 80 microg. de polyoside B, les deux "surnageants" précipitent aussi bien avec le polyoside qu'avec le sérum, ce qui prouve, nous l'avons vu (page 57), la complexité de cette solution antigénique. Avec le polyoside de Typhi murium, cette zone s'étend au moins entre 15 et 140 microg., notre étude n'ayant pas dépassé cette quantité d'antigène (°°).

Le polyoside typhique au contraire semble ne donner qu'une ligne de précipité, avec les deux techniques en milieu gélifié. L'étude quantitative de toutes les précipitations homologues ou croisées, consignée ci-dessus (tableaux N° XII à XVI) fournit toujours une zone étroite d'équivalence qui semblerait aussi en faveur de l'homogénéité de nos préparations. L'expérience N° 2 consignée dans la quatrième partie de cette discussion semblerait au contraire montrer que notre polyoside typhique est hétérogène. Cette contradiction nous amène à souligner que les techniques en milieu gélifié ne permettent pas toujours de dénombrer tous les composants, de l'avis même de leurs auteurs. Quant à l'étude des surnageants elle peut être

(°) Ce chapitre est le fruit de nombreuses discussions poursuivies avec Melle STAUB au sujet des résultats expérimentaux relatés ci-dessus.

(°°) Nous n'avons pas fait cette expérience, car on se trouverait alors dans un énorme excès de la fraction T.M.I. et la courbe de précipitation ne pourrait plus être comparable à celle du polyoside B (voir courbe théorique, figure 11, page 55)

fallacieuse. Le polyoside B, si nettement hétérogène, ne fournit-il pas lui-même une zone étroite d'équivalence dans l'étude des sérums antipara B ? (Tableaux XII et XV).

2°) Identité ou différence de constitution des polyosides extraits de diverses souches appartenant à la même espèce.

Les courbes de précipitation du sérum antityphique de cheval N° 4 par les différentes préparations de polyoside typhique (figure 12, tableau n° XII) montrent clairement l'identité immunologique de nos diverses préparations de polyoside typhique obtenues à partir de la souche O 90I et de la souche T 50-5. La même étude effectuée avec un sérum antityphique de lapin a confirmé ces résultats. Il semble donc qu'aussi bien du point de vue chimique que du point de vue immunologique, nos préparations de polyoside typhique soient identiques.

3°) Similitudes et différences de constitution des polyosides extraits de diverses espèces.

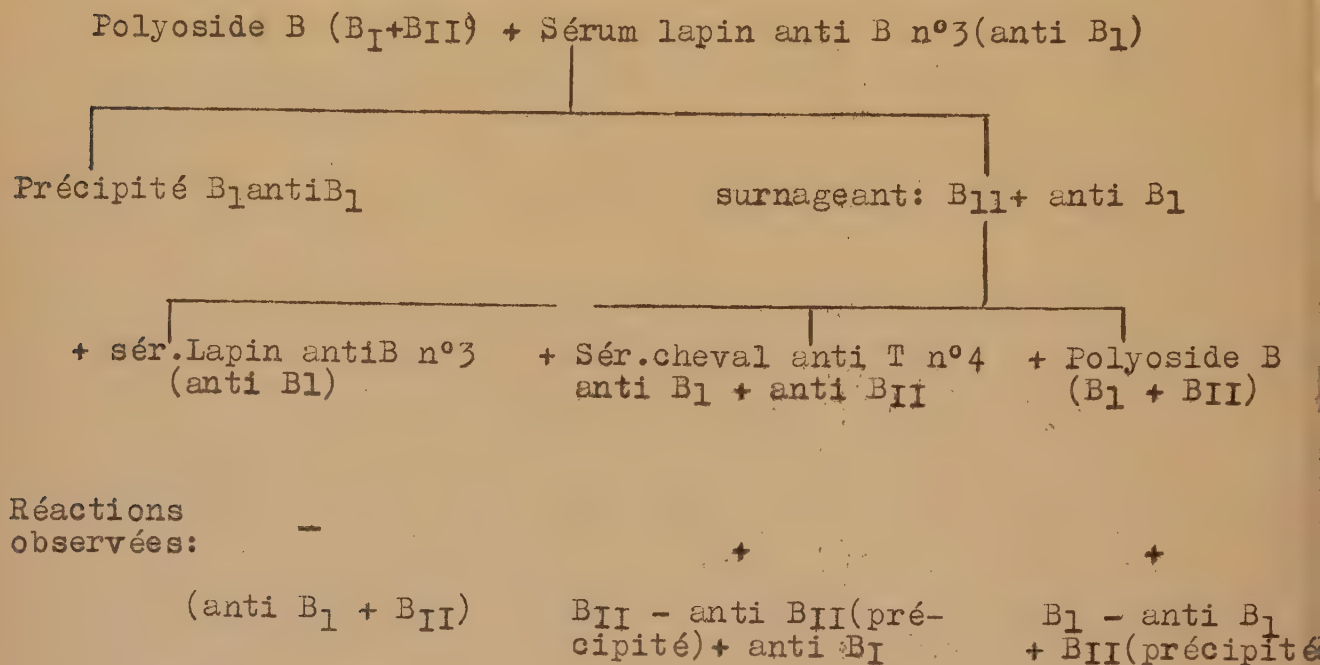
a) espèces appartenant à deux groupes différents.

Toutes les courbes obtenues avec les cinq sérums dont nous disposons montrent qu'il existe des réactions croisées lorsqu'on précipite des sérums avec les polyosides typhique, para B, et Typhi marium, ce que laissait prévoir la constitution antigénique des germes dont ils furent extraits qui possèdent en commun les antigènes I et XII. Cette réaction croisée est particulièrement marquée avec le sérum antityphique de cheval et le polyoside para B qui précipite 45 % des anticorps précipitables par le polyoside homologue. La courbe (B, figure 12) qui traduit cette précipitation peut se décomposer en 2 parties : la première part de l'origine et monte rapidement jusqu'au point E_1 qui représente le début de la zone de chevauchement, la seconde $E_1 - E_2$ présente une pente beaucoup plus faible. Cet aspect caractérise la présence de 2 systèmes précipitants conformément à ce que montre l'étude des surnageants et rappelle les résultats obtenus par HEIDELBERGER et KABAT (63) dans la précipitation des sérums anti-pneumocoque III par le polyoside S VIII. La pente très faible de la portion $E_1 E_2$ rappelait l'aspect des courbes de précipitation des 2 sérums antityphiques de lapin par le polyoside para B (figures 14 B et 16 B). Nous nous sommes demandée si le même antigène était responsable de la précipitation des sérums de lapin et de la précipitation du

sérum de cheval exprimée par la partie E_1E_2 de la courbe. Pour cela nous avons réalisé l'expérience suivante :

Expérience n° 1 -

On précipite 300 microg. de polyoside B, contenus dans 6 cm³ de solution physiologique, par 6 cm³ de sérum de lapin antityphique n° 3; ces proportions correspondent au point M de la courbe B, figure 16, et nous placent dans un large excès d'anticorps; après élimination du précipité, le surnageant ne précipite plus avec le sérum antityphique de lapin n°3, qui s'y trouve déjà en excès, mais il précipite avec le sérum antityphique de cheval n° 4 (cf. schéma ci-dessous).



Il y a donc dans notre polyoside B deux fractions distinctes : l'une B_I qui précipite le sérum antityphique de lapin N°3, l'autre B_{II} qui n'est pas précipitée par ce sérum de lapin mais qui précipite le sérum antityphique de cheval N° 4. Cette fraction B_{II} précipite-t-elle tous les anticorps du sérum de cheval N°4, précipitables par le polyoside entier ($B_I + B_{II}$) ? L'étude quantitative du précipité spécifique, obtenu avec le surnageant précédent (qui contient B_{II} et ne contient plus la fraction B_I du polyoside) et le sérum antityphique de cheval n° 4, montre que non, puisque le maximum d'azote précipité est de 48 microg. contre 80 microg. précipités par le polyoside total. Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau XVII où nous avons indiqué les quantités d'azote précipitées du même sérum par le polyoside B total ($B_I + B_{II}$), ce qui nous a permis de calculer par différence l'azote précipité par la fraction B_I .

TABLEAU XVII

Précipitation du s'rum antityphique de cheval n° 4 avec le polyoside par B et ses fractions

microg. de polyo- side ajoutés à 0,5 cm ³ de s'rum	Polyoside A total(B _I +B _{II})		Fraction B _{II} ^B surnageant de la précipita- tion du polyoside B par le s'rum n° 3		Fraction B _I chiffres calcu- lés par diffé- rence A - B
	microg. d'azote précipités	surnageant s a	microg. d'azote précipités	surnageant a	
10 ou 0,4 cm ³	60	-	38	-	22
20 ou 0,8 cm ³	76	+	46	-	30
30 ou 1,2 cm ³	80	+	48	-	32
40 ou 1,6 cm ³	90	+	46	-	44
50 ou 2 cm ³	89	+	44	-	45

x 1 cm³ du surnageant (de la précipitation du polyoside B par le s'rum n° 3) contient la fraction B_{II} présente dans 25 microg. (300 microg./12 cm³) de polyoside B.

Tous les signes de ce tableau sont expliqués p. 64.

r

s

s

y

3

te

Les courbes B, B₁ et B₂ de la figure 12 illustrent ces résultats. On voit que la fraction B_{II} donne une courbe de précipitation à plateau alors que la fraction B_I, qui est précipitée par le sérum antityphique de lapin n° 3, donne avec le sérum de cheval une courbe de précipitation à faible pente B₁ (responsable de la fraction E₁E₂ de la courbe obtenue avec le polyoside total) qui rappelle tout à fait la courbe de précipitation du polyoside B par le sérum antityphique de lapin n° 3 (figure 16).

De tout ceci on peut donc conclure que, conformément aux résultats fournis par l'étude des surnageants et des précipitations en milieu gélifié, le polyoside B contient au moins deux composants. L'un d'eux B_I est responsable de la précipitation croisée avec les sérums antityphiques de lapin et de la partie E₁E₂ de la courbe de précipitation croisée du sérum antityphique de cheval N° 4. La pente très faible des courbes de précipitation, dont cette fraction B_I est responsable indique qu'il faut une grande quantité du polyoside B qui la contient pour précipiter une faible quantité d'anticorps. On doit donc conclure soit que le polyoside B contient peu de cette fraction soit que cette fraction B_I ne contient que peu de "motifs antigéniques". Le deuxième composant B_{II} est responsable de la fraction OE₁ de la courbe de précipitation du sérum antityphique de cheval N° 4 par le polyoside B et ne précipite pas les sérums antityphiques de lapin. Elle est présente en assez forte proportion dans le polyoside B, ou possède un grand nombre de "motifs antigéniques".

L'expérience n° 4, consignée dans la quatrième partie de cette discussion, semble indiquer la présence d'une troisième fraction B III ne portant que les "motifs antigéniques" spécifiques du polyoside para B.

b) Espèces appartenant au même groupe (para B et Typhi murium)

L'examen des courbes de précipitation des 2 sérums antipara B (figures 13 et 15) et du sérum antityphique de cheval (figure 12) par les polyosides para B et T.M., montre tout de suite que si les précipitations par ces 2 polyosides donnent des résultats beaucoup plus semblables entre eux que ceux obtenus avec les polyosides typhique et para B, ils sont loin d'être identiques, en effet, si tous les anticorps des deux sérums antipara B, précipités par le polyoside para B, le sont aussi par le polyoside T.M., ce n'est plus vrai avec le sérum antityphique, le maximum atteint par la courbe du polyoside T.M. se situant nettement au-dessous de celui atteint par la courbe du polyoside para B. Il est vrai que la courbe continue à monter très lentement après le point d'équivalence et que l'on retrouve un large chevauchement des zones d'excès d'anticorps et d'antigène, comme avec le polyoside para B, puisque même avec 120 microg. le surnageant

77

précipite encore par addition d'antigène (tableau XII). Il se peut donc qu'avec une quantité beaucoup plus grande de polyoside T.M. on précipite tous les anticorps précipitables par le polyoside B. Ces résultats font supposer que les 2 fractions du polyoside B, qui réagissent avec le sérum antityphique de cheval, se retrouvent dans la préparation du polyoside T.M.; mais dans ce cas la fraction B_{II}, responsable de la précipitation E₁E₂ par le polyoside B est en beaucoup plus faible quantité; peut-être aussi est-elle plus dégradée et ne précipite-t-elle plus les mêmes anticorps.

Avec les 3 sérums, la courbe de précipitation du polyoside T.M. atteint son maximum avant la courbe du polyoside B. Ceci cadrerait bien avec l'explication précédente : le polyoside T.M., plus pauvre en la fraction B_{II}, est réciproquement plus riche que le polyoside B en la fraction B_I à laquelle correspond le plus grand nombre des anticorps.

Tous ces faits indiquent clairement, en accord avec les résultats de l'analyse chimique (analyse élémentaire, courbe d'hydrolyse) que nos préparations du polyoside B et du polyoside T.M. ne sont pas absolument identiques et ne reflètent pas tout à fait, par conséquent, l'identité antigénique attribuée aux germes dans le tableau de WHITE-KAUFFMAN.

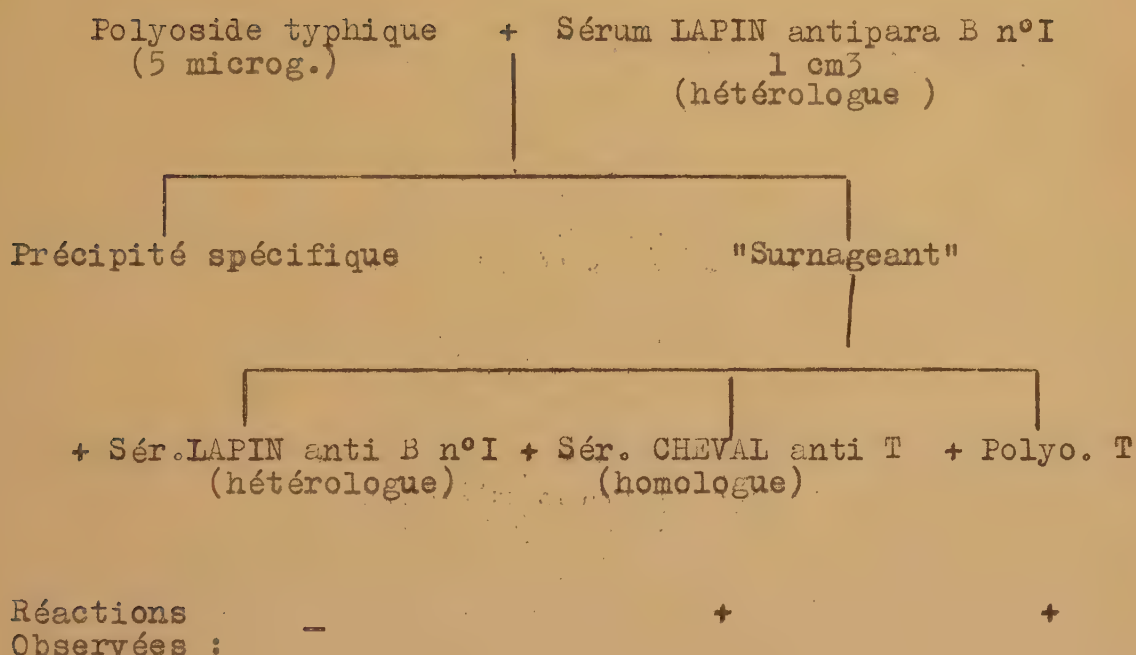
4° Les facteurs antigéniques de la classification de WHITE-KAUFFMAN sont-ils portés sur la même molécule ou sur des molécules séparées ?

Afin de nous rendre compte si les "motifs antigéniques" responsables des réactions croisées entre les polyosides typhiques et para B étaient portés sur la même molécule ou sur des molécules différentes, nous avons procédé aux expériences suivantes :

Expérience N° 2 -

5 microg. de polyoside typhique sont précipités par un excès du sérum antipara B de lapin (figure 15, point K de la courbe A), soit 1 cm³ (schéma ci-dessous). Après 48 heures à la glacière et centrifugation, nous avons ajouté à trois fractions du surnageant d'une part du sérum antipara B de lapin qui ne précipite plus puisqu'il est déjà en excès, d'autre part du polyoside T qui précipite puisqu'il y a un excès de sérum dans le surnageant, enfin du sérum antityphique de cheval n° 4 qui donne un anneau de précipitation.

Schéma de l'expérience n° 2



Ceci semble signifier qu'il y avait dans notre préparation de polyoside typhique 2 fractions, l'une T_I précipitable par le sérum antipara B de lapin, l'autre T_{II} ne précipitant pas avec ce sérum mais seulement avec le sérum antityphique de cheval N° 4. Il était logique de penser que la fraction T_I portait les "motifs antigéniques" communs aux polyosides B et T puisqu'elle était précipitée par le sérum antipara B tandis que la fraction T_{II}, ne précipitant que par le sérum homologue, ne porterait que les "motifs antigéniques" propres au polyoside T. Toutefois, ces conclusions ne sont pas en accord avec l'expérience N° 3 qui répète l'expérience N° 2 en utilisant le sérum antipara B de cheval N° 5 au lieu du sérum de lapin N° I.

Expérience N° 3.

On précipite 10 microg. de polyoside T par 2 cm³ du sérum antipara B de cheval N° 5 ce qui correspond au point L de la courbe A, figure 19, et nous place dans un large excès d'anticorps. Après élimination du précipité l'étude du surnageant montre qu'il précipite par addition du polyoside T (puisque l'on a un excès d'anticorps) et ne précipite pas avec le sérum antipara B de cheval N° 5 déjà en excès; mais cette fois il ne précipite pas non plus avec le sérum de cheval antityphique N° 4 contrairement à ce qui se passait dans l'expérience précédente.

Schéma de l'expérience N° 3

Polyoside T. + Sérum CHEVAL antipara B N°5
(5 microg.) (hétérologue) (1 cm³)

Précipité spécifique

"Surnageant"

+ Sér. CHEVAL para B N°5 + Sér. CHEVAL anti T n°4 + Polyo.T
(hétérologue) (hétérologue)

Réactions
observées:

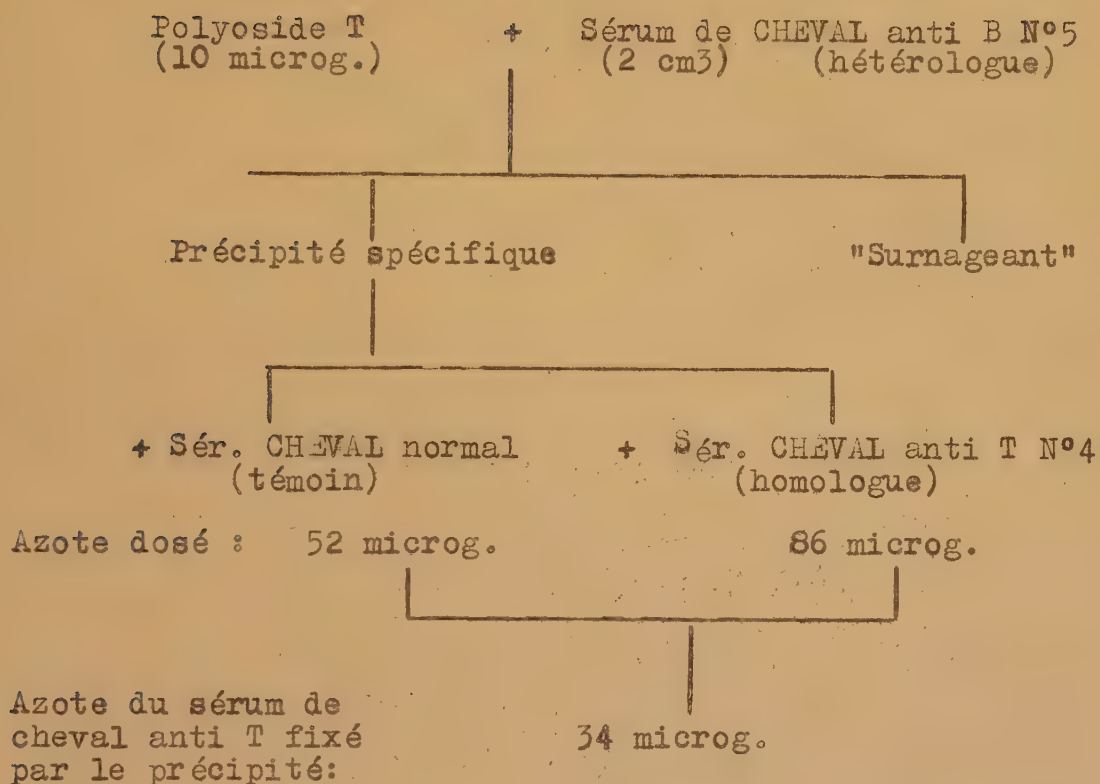
+

Si donc il existe bien 2 fractions T_I et T_{II} comme semblait l'indiquer l'expérience N°2, il faut penser qu'elles sont précipitées toutes les deux par le sérum de cheval antipara B et par conséquent que la fraction T_{II} contient aussi bien les "motifs antigéniques" communs aux deux polyosides T et B que les "motifs" propres au polyoside T. L'expérience N° 6 montre qu'il en est bien ainsi.

Expérience N° 6

On précipite 10 microg. de polyoside T par un excès de sérum antipara B de cheval N° 5, soit 2 cm³, après lavage du précipité, on ajoute au précipité soit 1 cm³ de sérum de cheval normal ("témoin"), soit 1 cm³ de sérum antityphique de cheval N° 4. Après 48 heures de contact à + 4° on centrifuge, on lave le précipité et on dose l'azote suivant la technique habituelle.

Schéma de l'expérience N° 6



Les chiffres de ce schéma (moyenne de deux expériences) montrent qu'il y a 34 microg. d'azote du sérum de cheval N°4 fixés sur le précipité et par conséquent que le polyoside T, présent dans ce précipité, possédait des "motifs antigéniques" libres capables de fixer des anticorps du sérum T. Ces "motifs" ne peuvent pas être ceux communs avec le polyoside B déjà saturés par les anticorps du sérum antipara B en excès, ce sont donc bien des motifs antigéniques propres au polyoside T qui se trouvent ainsi fixés sur la même molécule que les motifs communs avec le polyoside B.

Des expériences semblables aux expériences 5 et 6 effectuées avec les polyosides B et T.M. et leurs sérums hétérologues sont résumées dans les schémas suivants :

I

Polyoside B précipité avec le sérum
antityphique de cheval N° 4 -

I. Etude du "surnageant"

Expérience N°4

Polyoside B + sérum CHEVAL anti T.N° 4
 (30 microg.) (2 cm³)

précipité

"Surnageant"

+ Sérum cheval
anti T n° 4+ sérum cheval
anti B n° 5

+ Polyoside B

Réactions
observées

-

+

+

II. Etude du précipité

Expérience N°7

Polyoside B + Sérum cheval anti T n° 4

Précipité

"Surnageant"

+ Sérum cheval normal
(témoin)↓
azote dosé
159 microg/

+ Sérum cheval anti B N° 4

↓
azote dosé
218 microg.Azote du sérum cheval
anti B fixé par le
précipité

59 microg.

II

Polyoside T.M. précipité avec le sérum anti-
typhique de cheval n° 4 -

I. Etude du "surnageant"

Expérience N° 5

Polyoside T.M. + Sérum cheval anti T n° 4
 (10 microg.) (2 cm³)

précipité

"surnageant"

Sérum cheval
anti T N° 4Sérum cheval
anti B N° 5

Polyoside T.M.

Réactions
observées:

-

+

+

II. Etude du précipité

Expérience N° 8

Polyoside T.M. + Sérum cheval T N°4

Précipité

"Surnageant"

+ Sérum cheval normal
(témoin)

+ sérum cheval anti B N°4

azote dosé : 71 microg.

93 microg.

azote du sérum de cheval
anti B fixé par le
précipité

29 microg.

Des raisonnements analogues à ceux que nous avons développés pour les expériences 2 et 3 montrent que les polyosides B et T.M. contiennent une fraction qui précipite le sérum homologue et qui n'est pas précipitée par le sérum hétérologue (expériences 4 et 5). Nous appellerons cette fraction B_{III} (ou T.M._{III}) puisque nous avons vu (2^e partie de cette discussion) que les polyosides B et T.M. contiennent déjà deux fractions précipitables par les sérums hétérologues. Elle contient les motifs antigéniques propres aux polyosides B et T.M. Par contre, en appliquant aux expériences 7 et 8 un raisonnement identique à celui que nous avons développé pour l'expérience 6 on peut conclure que les fractions B_I et B_{II} et T.M._I et T.M._{II} qui portent les motifs antigéniques communs aux polyosides B et T ou TM et T portent aussi bien les motifs antigéniques propres aux polyosides B et TM.

On peut résumer les résultats de cette quatrième partie dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Différentes fractions antigéniques contenues dans les polyosides

	Fractions	motifs antigéniques	Précipitation avec		
			sérums homologues	sérums hétérologues de cheval	sérums hétérologues de lapin
Polyoside T	T _I	KLT	+	+	+
	T _{II}	KT	+	+	-
Polyoside B	B _I	KLB	+	+	+
	B _{II}	KB	+	+	-
	B _{III}	B	+	-	-
Polyoside T.M.	TM _I	KLB	+	+	+
	TM _{II}	KB	+	+	+
	TM _{III}	B	+	-	-

KL motifs antigéniques communs aux polyosides T et B ou T.M.
 T motifs antigéniques propres au polyoside T
 B motifs antigéniques propres aux polyosides B et T.M.

DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE

A l'issue de ce travail, quels renseignements nouveaux avons-nous sur la constitution chimique des Polyosides spécifiques O des Salmonelles préparés par hydrolyse acétique ?

1°) Lorsqu'on part d'une même espèce (même souche ou souche différente) l'hydrolyse acétique fournit des préparations identiques entre elles. Du point de vue chimique, la seule différence consiste en de légères variations dans les traces d'azote ou de glucosamine dues probablement à quelques impuretés. Du point de vue immunologique, le même poids des diverses préparations de polyoside précipite la même quantité d'azote d'un même immunsérum.

2°) Ces préparations, quoique identiques entre elles, ne sont pas homogènes -

L'étude immunochimique nous a, en effet, révélé la présence d'au moins deux fractions dans le polyoside T, l'une T₁, qui est précipitée par un sérum de lapin antipara B, et l'autre T₂, qui ne l'est pas. Elle nous a également démontré l'existence d'au moins 3 fractions distinctes dans les polyosides para B et typhi-murium. L'une B_I (et TM_I) porte des motifs antigéniques, communs entre ces polyosides et le polyoside T, dont les anticorps homologues se trouvent aussi bien dans les sérums antityphiques de lapin que de cheval. La seconde B_{II} (et TM_{II}) porte des motifs antigéniques, communs entre ces polyosides et le polyoside T, mais dont les anticorps homologues ne sont présents que dans le sérum antityphique de cheval. Enfin, la 3^e fraction porte uniquement des motifs antigéniques propres au polyoside B.

Les fractions B_I, (TM_I) et B_{II}, (TM_{II}) portent aussi des motifs antigéniques propres au polyoside B (et T.M.) sans que nous sachions encore si ces "motifs" sont identiques à ceux de B_{III} (et TM_{III}).

Malheureusement, jusqu'à présent, nous ne connaissons de ces fractions que leur existence; le temps et le matériel nous ont manqué pour tenter un fractionnement sur colonne de cellulose, par exemple, qui a donné de si bons résultats pour d'autres polyosides, comme les polyosides du topinambour entre les mains de DEDONDER (64).

Il serait intéressant, en effet, d'essayer de relier les différences antigéniques observées à des différences chimiques.

Une question se pose à propos de ces fractions : préexistent-elles comme telles au sein de germes ou ne sont-elles que le résultat de l'hydrolyse acétique ? Bien que nous ne puissions pas absolument affirmer qu'il s'agisse d'une grosse molécule unique, scindée par l'hydrolyse acétique, 2 séries d'arguments sont plutôt en faveur de cette hypothèse :

a) le fait que nos préparations, bien qu'étant des mélanges, soient toujours si identiques à elles-mêmes, plaide plutôt en faveur de la scission d'une molécule identique, car il est moins vraisemblable qu'à l'intérieur des germes, les différents polyosides se trouvent toujours dans le même rapport.

b) les polyosides que nous avons préparés sont de petites molécules dialysables, alors que les diverses préparations d'antigène somatique dont on peut les extraire (BOIVIN, MORGAN) ne sont pas dialysables. Ces préparations d'antigène somatique sont donc constituées par des molécules beaucoup plus grosses, LUDERITZ en particulier donne un poids moléculaire aux environs de 1 million pour sa préparation. Or, ces antigènes somatiques sont constitués par 50 % à 75 % de polyosides semblables aux nôtres. Il faut donc que ces polyosides y existent sous une forme plus complexe. C'est ce que montre aussi l'analyse immuno-chimique de l'antigène de BOIVIN, puisqu'il faut 12 fois plus d'antigène somatique pour précipiter une certaine quantité d'anticorps, qu'il ne serait nécessaire si tous les "motifs antigéniques" du polyoside qu'il contient étaient libres (STAUB et COMBES, 64 a).

Si nos fractions polyosidiques sont vraiment des fragments d'une grosse molécule unique, une 2^e question se pose :

Comment sont-elles liées au sein de ces grosses molécules d'où elles proviennent ? Nous n'en savons rien encore, mais il est curieux de constater que plus les molécules de polyoside sont grosses, plus elles contiennent de glucosamine (5% dans une préparation de polyoside extrait des germes non plus par hydrolyse acétique mais par une hydrolyse alcaline 13,5% dans le polyoside du gros antigène somatique de LUDERITZ) alors que partout nos petites fractions n'en contiennent qu'à l'état de trace ; on en vient donc à se demander si cette glucosamine ne jouerait pas un rôle dans la liaison de nos fractions au sein de la molécule polyosidique présente dans l'antigène somatique.

3°) La comparaison entre les résultats, tant chimiques qu'immunologiques, montre que les polyosides extraits de 2 salmonelles possédant les mêmes antigènes O, sont assez semblables mais non identiques.

Les polyosides B et TM contiennent, en effet, la même quantité de sucres réducteurs; ils précipitent les mêmes anticorps des sérums homologues (et peut-être du sérum de cheval hétérologue); ils fournissent à l'analyse chromatographique les mêmes sucres, dans les mêmes proportions.

Mais : a) leurs courbes d'hydrolyse diffèrent très nettement, les sucres du polyoside TM étant beaucoup plus vite libérés que ceux du polyoside B - b) les courbes de précipitation spécifique qu'ils donnent, tant avec les immunosérums homologues (de cheval et de lapin) qu'avec un immunosérum antityphique de cheval sont, elles aussi, très différentes.

Ces ressemblances et différences chimiques et immunologiques s'expliquent si on suppose que les fractions TM_1 , TM_2 et TM_3 du polyoside TM sont chimiquement et immunologiquement identiques aux fractions B_1 , B_2 et B_3 du polyoside B, mais qu'elles ne sont pas présentes dans les mêmes proportions, la fraction B_1 devant en particulier être beaucoup plus abondante dans le polyoside B que la fraction TM_1 dans le polyoside TM.

4°) La comparaison entre les résultats, tant chimiques qu'immunologiques, montre que les polyosides extraits de souches (polyoside typhique T et para B) possédant des antigènes O communs et des antigènes O différents, contiennent des "motifs antigéniques" communs et des "motifs antigéniques" différents.

Comme nous l'avons souligné dans le 2ème paragraphe de cette discussion, il ne nous a pas été possible d'étudier chimiquement les fractions séparées des polyosides T et B. L'étude chimique n'a donc porté que sur le mélange des fractions T_1 et T_2 et des trois fractions B_1 , B_2 et B_3 , et ne peut que souligner les différences entre les 2 polyosides.

a) Les groupements acétylés sont nettement plus nombreux dans le polyoside B (6,5%) que dans le polyoside T (2,2%). Comme nous avons vu que ces groupements pouvaient être liés au groupement méthyl du rhamnose et de l'éventuel sucre méthyle (non encore identifié), il faudrait en conclure que ces groupements méthylés sont plus abondants dans le polyoside para B que dans le polyoside T.

b) Les courbes d'hydrolyse sont très différentes, et le taux en sucres réducteurs aussi. Même après avoir corrigé les valeurs trouvées, en se rapportant à la courbe du glucose, par celles que permet de calculer la composition réelle du polyoside telle que la fournit l'analyse chromatographique le polyoside typhique libère, après 6 heures d'hydrolyse (par une solution normale de SO_4H_2) 95% de sucres réducteurs alors que le polyoside para B n'en libère que 56%. Ceci pourrait s'expliquer, comme le taux élevé en groupements acétylés, par la plus grande abondance du sucre inconnu dans le polyoside B puisque, dans ce cas comme dans celui du polyoside T, ce constituant est presque totalement détruit après 6 heures d'hydrolyse.

c) La composition en sucres constitutifs est totalement différente non seulement quantitativement, mais qualitativement. En effet, si les glucose, galactose, mannose et rhamnose, bien qu'en proportions différentes, sont présents dans les 2 polyosides, le 5ème constituant identifié pour les polyosides para B et TM est certainement différent du 5° constituant du polyoside T puisque sur un même chromatogramme, leurs R_f sont différents.

d) Enfin, l'étude immunologique montre que le polyoside T ne précipite qu'une fraction des anticorps précipitables par le polyoside B d'un sérum anti para B et réciproquement le polyoside B ne précipite jamais qu'une fraction des anticorps précipitables par le polyoside T d'un sérum anti-typhique. Les polyosides T et B possèdent donc des motifs antigéniques communs et d'autres qui leur sont propres. Le schéma XVIII de la page 83 qui résume nos résultats montre que seule la fraction BIII porterait uniquement des motifs antigéniques propres au polyoside B, toutes les autres fractions portent un mélange de "motifs" propres et communs.

5°) Dans les 4 premières parties de cette discussion, nous avons résumé les connaissances acquises au cours de cette étude sur les fractions polyosidiques extraites des germes, au moyen de l'hydrolyse acétique, fragments vraisemblablement des grosses molécules polyosidiques présentes dans les agglutinogènes (ou antigènes somatiques) des *Salmonelles*. Parmi ces fragments, les uns précipitent les antisérums homologues et hétérologues, d'autres seulement les sérums homologues. Une dernière question se pose. Quel rapport y-a-t-il entre ces fractions que nous avons étudiées et les antigènes dénombrés dans le tableau de WHITE-KAUFFMAN et est-il possible de tirer de leur étude des renseignements concernant les antigènes I, IV, V, IX et XII de ce tableau ?

Une étude immunologique détaillée, qui sort du cadre de ce travail, que nous avons effectuée en collaboration

avec Melle STAUB et M. DAVARPANAH (65) a montré que nos préparations de polyoside T B ou T M n'étaient pas les antigènes du tableau de WHITE KAUFFMANN. Par contre, il est certain que ces antigènes contiennent les polyosides que nous avons étudiés. En d'autres termes, les antigènes I, XII, par exemple de S. Typhi, contiennent nos fractions polyosidiques II et III, si donc ces antigènes étaient des molécules distinctes, nous devrions trouver une fraction (provenant des antigènes XII par exemple) portant seulement des motifs antigéniques communs entre S. Typhi et para B à l'exclusion des motifs propres à S. Typhi (présents dans l'antigène IX). Or nous avons vu (4^e partie de cette discussion) que tel n'était pas le cas. La fraction T₁ qui contient les motifs antigéniques communs, en contient aussi d'autres qui sont propres à S. Typhi. Les antigènes I, IX et XII doivent donc être non pas des molécules distinctes mais des "motifs antigéniques" portés par une même grosse molécule, ce qui complique d'autant leur étude.

Néanmoins des fractions telles que BIII ou TMIII (schéma XVII) semblent plus simples que les autres. Leur étude permettrait de connaître quelques éléments des antigènes IV et V de S para B et de S. Typhi murium. C'est ce qui nous incite à essayer de séparer les diverses fractions de nos polyosides et à en poursuivre l'analyse chimique.

RÉSUMÉ



RESUME

La classification des Salmonelles d'après leur formule antigénique par WHITE et LAUFFMANN rend les plus grands services dans le domaine médical, mais on ignore encore l'identité chimique des antigènes O (somatiques) et H (flagellaires) qui y figurent.

Laissant de côté l'étude de l'antigène H dont on sait seulement qu'il est de nature protéique, nous nous sommes attachée dans ce travail à l'étude de l'antigène O. Les travaux de nombreux auteurs ont abouti à rattacher la spécificité O des germes à une fraction polysidique que l'on retrouve dans toutes les préparations d'antigène somatique. Ces diverses préparations de polyside purifié ne sont plus antigéniques mais elles précipitent spécifiquement les sérums nomologues et hétérologues.

En Angleterre FREEMAN, en Russie ELKIN et au Japon YOKOYAMA ont déjà analysé chimiquement le polyside extrait des Salmonelles par des méthodes différentes.

1°) Nous avons préparé, par hydrolyse acétique des germes, les polysides de S. Typhi, S. para B, S. Typhi murium. Nous les avons ensuite purifiés par des précipitations fractionnées alcooliques et acétiques en suivant la technique utilisée par FREEMAN.

2°) Afin de pouvoir déterminer la composition en sucres de ces polysides, nous avons choisi ou adapté des techniques nous permettant de travailler avec de très petites quantités de polyside : dosage des sucres réducteurs par la méthode de SOMOGYI-NELSON - Analyse qualitative et quantitative par chromatographie sur papier. Cette dernière technique a nécessité un long travail de mise au point - nous avons choisi la méthode de DUBOIS SMITH qui dose les sucres par la réaction qu'ils donnent avec le phénol et l'acide sulfurique. Pour séparer les glucose, galactose, mannose, il nous a fallu utiliser un mélange Butanol-pyridine-eau, qui gêne le dosage par le phénol. D'où la nécessité de laver les chromatogrammes par l'éther, puis de les laisser sous vide pour éliminer les restes de pyridine.

3°) L'analyse chimique des diverses préparations de polyside Typhique (souche O 901 et T 50-5) donne des résultats identiques :

- Bilan de l'analyse du polyoside typhique -

A	glucose		25 %	
	mannose		25 %	
	rhamnose		20 %	
	X (méthyl désoxyglucose ?)		5 à 10 %	
90% de sucres réducteurs				
	Phosphates (P:0,4 à 0,9%)	1,2 - 2,7 %	moyenne	2%
B	acides aminés		0,3 - 2,5 %	moyenne
	glucosamine		1,5 - 0 %	2%
	acétyl (fixé sur gluco-			
	samine et peut-être sur			
6,5% de composants non glucidiques				
	les sucres méthylés)....	3 - 2,2%	moyenne	2%

Ce résultat est un peu différent de celui de FREEMAN bien qu'il ait utilisé la même technique de préparation que nous. Cette différence peut tenir soit aux souches, soit au milieu de culture.

L'analyse immunologique confirme l'identité de nos préparations.

4°) L'analyse chimique des Polyosides para B et Typhimurium donne des résultats très voisins :

- Bilan -

		B	T.M.
A	Glucose	5%	5
	mannose	20%	20%
	galactose	18%	18%
	rhamnose	13%	13%
	X	-	-
partie glucidique			
B	Phosphates	1,5%	3%
	acides aminés	2 %	5%
	glucosamine	traces	2,6 %
	acétyl	6,6%	5,5
partie non glucidique.			

bien que les courbes d'hydrolyse (Solution normale de SO_4H_2) soient nettement différentes.

L'étude immunologique (page 64) révèle aussi des différences : les 2 polyosides précipitent les mêmes anticorps des sérums para B, peut-être les mêmes antigènes du sérum antityphique de cheval, mais leurs courbes de précipitation diffèrent notablement, le maximum de précipitation étant plus vite atteint avec le polyoside T.M. qu'avec le polyoside para B. L'étude immunologique montre également que ces préparations de polyoside sont constituées de 3 fractions distinctes B_I B_{II} B_{III} (et TM_I TM_{II} TM_{III}) dont les 2 premières portent des motifs antigéniques communs avec le polyoside T et la 3^e seulement les motifs antigéniques spécifiques des polyosides para B et T.M. Ces trois fractions que nous n'avons pas séparées et dont nous ne connaissons pas la composition chimique, seraient les mêmes dans les deux polyosides ; seules leurs proportions varieraient de l'un à l'autre, ce qui expliquerait les différences tant chimiques qu'immunochimiques observées.

5°) Au cours de la discussion générale, ces résultats sont comparés à la composition antigénique attribuée aux germes dans le tableau de WHITE-KAUFFMANN.

B I B L I O G R A P H I E

- (47) ANNISON E.F. et MORGAN W.T.J.- Studies in immunochemistry. The isolation and properties of the human blood group H substance.- Biochem. Jl. (1952) 52, 247.
- (3) ARKWRIGHT J.A.- Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and by specific sera.- Jl. Path. Bact. (1920) 23, 358.
- (40) BLASS J., MACHEBOEUF M., NUNEZ G.- Méthode de microdosage des oses pouvant s'appliquer à l'étude des spots de chromatogrammes sur papier.- Bull. Chim. Biol. (1950) 32, 130.
- (12) BOIVIN A. et MESROBEANU L.- Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Substances azotées et phosphorées "acido-solubles".- C.R. Soc. Biol. (1933) 112, 76.
- (45) BOGGS L., CUENDET L.S., EHRENTAL I., KOCH R. et SMITH F.- Séparation and identification of sugars using paper chromatography.- Nature (1950) 166, 520.
- (6) CASTELLANI A.- Die agglutination bei gemischter infection und die Diagnose der litzteren.- Z. Hyg. Infekt. (1902) 40, 1.
- (44) CHARGAFF E., LEVINE C. et GREEN C.G.- Techniques for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents, sulfur-containing amino-acids, and reducing sugars.- Jl. Biol. Chem. (1948) 175, 67.
- (54) COHN M. et PAPPENHEIMER A.M.- A quantitative study of the diphtheria toxin-antitoxin reaction in the sera of various species including man.- Jl. Immunol. (1949) 63, 291.
- (31) DEDONDER R.- Glucides et composés voisins in "Journée de la chromatographie sur papier", Paris 1952.

- (64) DEDONDER R.- Les glucides du topinambour.- Bull. Soc. Chem. Biol. (1952) 34, 144.
- (41) DUBOIS M.- Thèse Université de Saint-Paul, Minnesota (1952)
- et DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F.- A colorimetric method for the determination of sugars.- Nature (1951) 168, 167.
- (17) ELKIN S.B.- Etude chimique des polyosides caractéristiques de trois espèces de Salmonella (russe).- Biochimia (1951) 16, 133.
- (23) ELSON L.A., MORGAN W.T.J.- A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine.- Biochem. Jl. (1933) 27, 1824.
- (48 a) FLEURY P., EBERARD R.- Recherches sur le dosage des protéines par la méthode photométrique au biuret selon la technique de Gornall.- Ann. biol. clin. (1951) 2, 453.
- (43) FLOOD A.E., HIRST E.L., JONES J.K.N.- Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part I : Standardisation of procedure.- Jl. Chem. Soc. (1948) 2, 1679.
- (15) FREEMAN G.G.- The preparation and properties of a specific polysaccharide from Bact. typhosum Ty2.- Biochem. Jl. (1942) 36, 340.
- (16) FREEMAN G.G.- The components of the antigenic complex of Salmonella typhi murium.- Biochem. Jl. (1943) 37, 601.
- (8) FURTH J. et LANDSTEINER K.- Studies on the precipitable substances of Bacilli of the Salmonella Group.- Jl. Exp. Med. (1928) 47, 171.
- (29-48) HAGEDORN H.C. et JENSEN B.N.- Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid.- Bioch. Zeit. (1923) 135, 46.

- (63-53) HEIDELBERGER M., KABAT E.A. et MAYER M.- A further study of the cross reaction between the specific polysaccharides of types III and VIII pneumococci in horse sera.- Jl. exp. Med. (1942) 75, 35.
- (51) HEIDELBERGER M. et KENDALL E.F.- Quantitative studies on the specific reaction, the determination of small amounts of a specific polysaccharide.- Jl. exp. Med. (1932) 55, 555.
- (52) HEIDELBERGER M. et KENDALL E.F.- The precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody : III. A quantitative study and theory of the reaction mechanism.- Jl. exper. Med. (1935) 61, 563.
- (55) HEIDELBERGER M. et KENDALL E.F.- The reaction between crystalline egg-albumin and its homologous antibody.- Jl. Exp. Med. (1935) 62, 697.
- (13-20) HENDERSON D.W. et MORGAN W.T.J.- The isolation of antigenic substances from strains of Bact. Typhosum.- Brit. Jl. exp. Pathol. (1938) 19, 82.
- (38) HIRST E.L., HOUGH L. et JONES J.K.N.- Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part II : The separation and determination of methylated aldoses.- Jl. chem. Soc. (1949) 1, 928.
- (39) HIRST E.L. et JONES J.K.N.- Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part III : Determination of the sugars by oxydation with sodium periodate.- Jl. Chem. Soc. (1949) 2, 1569.
- (21-57) HORNUS J.P. et GRABAR P.- Relations quantitatives entre l'antigène glucide-lipidique O et le haptène glucidique du bacille typhique et les immunosérums de lapin.- Ann. Inst. Past. (1941) 66, 134.
- (33) JERMYN M.A., ISHERWOOD A.- Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram.- Biochem. Jl. (1949) 44, 402.

- (59) KABAT E.A. et MAYER M.- Experimental immunochemistry.- U.S.A. Thomas, 1948.
- (56) KAMINSKI M. et OUCHTERLONY O.- Etudes immunochimiques qualitatives et quantitatives des protéides du blanc d'oeuf. Bull. Soc. Chim. biol. (1951) 33, 758.
- (5) KAUFFMANN F.- in Enterobacteriaceae, Ejnar Munksgaard, Copenhagen (19(1).
- (42) KOCH R.B., GEDDES W.F. et SMITH F.- The carbohydrates of Graminae. I. The sugars of the flour of wheat.- Cereal chemist (1951) 28, 424.
- (7) KRUMWIEDE C. et COOPER G.M.- A study of the specificity of the absorption of antibacterial precipitins.- Jl. Imm. (1920) 5, 547.
- (25) LOISELEUR J.- Techniques de Laboratoire.- E. Masson, Paris 1954.
- (34) Mc FARREN E.F., BRAND K. et RUSTOSK H.R.- Quantitative determination of sugars on filter paper chromatograms by direct photometry.- Anal. chem. (1951) 23, 1146.
- (14) MORGAN W.T.J. et PARTRIDGE S.M.- A examination of the antigenic complex of Bact. Typhosum.- Brit. Jl. exp. Pathol. (1942) 23, 151.
- (28-49) NELSON N.- A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.- J. Biol. Chem. (1944) 153, 375.
- (60) OUDIN J.- L'analyse immunologique qualitative. Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé.- Ann. Inst. Past. (1948) 75, 30 et 109.
- et Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.- Methods in Medical Research. Year Book publishers - Chicago (1953) 5, 335.
- (61) OUCHTERLONY O.- Antigen-antibody reaction in gels.- Acta path. microbial scandinav. (1949) 26, 507.
et (1953) 32, 231.

- (30) PARTRIDGE S.M.- Filter paper partition chromatography of sugars. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep.- Biochem. Jl. (1948) 42, 239.
- (46 a) PON G. et STAUB A.M.- Etude chimique du polyside somatique typhique.- Bul. Soc. Chim. Biol. (1952) 34, 1132.
- (11) RAISTRICK H. et TOPLEY W.W.C.- Immunising fractions isolated from Bact. Aertrycke.- Brit. Jl. exp. Pathol. (1934) 15, 113.
- (24) RIMINGTON C.- Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins.- Bioch. J. (1940) 34, 931.
- (46) SEVAG M.G.- Eine neue physikalische Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch wirksamer substanzen.- Bioch. zeit. (1934) 273, 419.
- (1) SMITH T., REAGL A.L.- The non-identity of agglutinins acting upon the flagelle and upon the body of bacteria. Jl. med. Res. (1903) 10, 89.
- (27-49) SOMOGYI M.- A new reagent for the determination of sugars.- Jl. Biol. chem. (1945) 160, 61.
- (22-58) STAUB A.M. et COMBES R.- Essai de dosage des antigènes somatiques au sein de S. typhi.- An. Inst. Pasteur (1951) 80, 21.
An. Inst. Past. (1952) 83, 528.
- (65) STAUB A.M., PON G. et DAVARPANAH C.- Rôle des polysides spécifiques dans l'agglutination des Salmonelles.- VIe Congrès International de Microbiologie, Rome 1953.
et STAUB A.M.- Ann. Inst. Past. (sous presse)
- (26) TABONE J.- Etude des radicaux acétylés liés aux protéides sériques.- Thèse Fac. Sciences Paris, 1941.
- (35) WALLENFELS K.- Über einen neuen Nachweiss reduzierender zucker in Papierchromatogram und dessen quantitative auswertung.- Naturwiss. (1950) 37, 491.

- (2) WEIL E. et FELIX A.- Weitere untersuchungen über das wesen Fluckfieberagglutination.- Wien. Klin. Wschr. (1917) 30 1509.
- (36) WESTPHAL O. et LUDERITZ O.- Ueber die chemische analyse hochgereinigter bakterienpolysaccharide.- Deutsche Med. Woch. (1953) 21, 775.
- (50) WESTPHAL O. et LÜDERITZ O.- Communication au VIe Congrès International de Microbiologie, Rome 1953.
et communication personnelle.
- (4) WHITE P.B.- On the relation of the alcohol-soluble constituents of bacteria to their spontaneous agglutination.- Jl. Pathol. Bact. (1927) 30, 113.
- (10-19) WHITE P.B.- Observations on Salmonella agglutination and related phenomena. Fixation of somatic agglutinins by receptors in solution.- Jl. pathol. Bact. (1931) 34, 325.
- (18) YOKOYAMA Sigeyosi.- "Etude sur le polyoside de Salmonella Typhi" (japonais).- Tohoku. Ig. Z. (1943) 33, 100.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Historique	1
Travail personnel	5
Plan du travail	6

ETUDE CHIMIQUE

<u>CHAPITRE I : Préparation des polyosides</u>	7
Préparation du lot I de polyoside typhique	7
Préparation des germes secs	7
Hydrolyse	8
Purification	8
Rendement	10
Préparation des polyosides des autres souches	10

<u>CHAPITRE II : Choix et mise au point des techniques utilisées</u>	
<u>pour l'étude des polyosides</u>	11
Dosage des radicaux acétylés	12
A. Dosage des sucres réducteurs	12
I. Méthode de SOMOGYI-NELSON	12
II. Méthode de HAGEDORN-JENSEN	15
III. Courbes d'hydrolyse	16
B. Identification des sucres par chromatographies	16
I. Hydrolyse	17
II. Identification des sucres	17

C. Dosage des sucres par chromatographie	20
I. Choix d'une méthode	20
II. Mise au point du dosage d'après la méthode de DUBOIS-SMITH	21
Dosage sans chromatographie	21
Hydrolyse	23
Séparation des sucres sur le chromatogramme et élution	24
Choix d'un solvant	25
Dosage après chromatographie	27

CHAPITRE III : Résultats expérimentaux 31

Analyse élémentaire	31
Dosage de la glucosamine	32
Dosage des radicaux acétylés	34
Etude des courbes d'hydrolyse	34
Identification des sucres par chromatographie	38
Chromatographie au cours de l'hydrolyse	38
Etude de la tache C	38
Identification de la tache B	43
Essai d'identification de la tache A	43
Dosage des sucres séparés par chromatographie	45

CHAPITRE IV : Discussion 47

Polyoside typhique	47
Polyosides para B et Typhi murium	51

ETUDE IMMUNOCHIMIQUE 55

Introduction : but du travail	56
Matériel et techniques	58
Préparation des immunsérums	58
Technique de HEIDELBERGER et KENDALL	61
Technique de OUDIN	62
Technique de OUCHTERLONY	62

Résultats expérimentaux	64
Discussion	73
1) Homogénéité des polyosides	74
2) Identité ou différence de constitution des polyosides extraits de diverses souches appartenant à la même espèce.	74
3) Similitude et différence de constitution des polyosides extraits de diverses espèces	74
a) espèces appartenant à deux groupes différents	74
b) espèces appartenant au même groupe	76
4) Les facteurs antigéniques de la classification de WHITE-KAUFFMANN sont-ils portés sur la même molécule ou sur des molécules séparées ?	77
 DISCUSSION GENERALE et CONCLUSIONS	 84
 RESUME	 89
 BIBLIOGRAPHIE	 92

